

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 659**

51 Int. Cl.:  
**A01K 67/027** (2006.01)  
**C12N 9/64** (2006.01)  
**A61K 49/00** (2006.01)  
**A61K 31/58** (2006.01)  
**A61P 17/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02720389 .2**  
96 Fecha de presentación: **08.02.2002**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1367886**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.12.2003**

54 Título: **RATONES TRANSGÉNICOS SCCE Y SU USO COMO MODELOS DE ENFERMEDAD HUMANA.**

30 Prioridad:  
**09.02.2001 DK 200100218**  
**09.02.2001 CA 2332655**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**02.12.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**02.12.2011**

73 Titular/es:  
**EGELRUD, TORBJORN**  
**GENERALSGATAN 11**  
**S-903 36 Umeå, SE y**  
**HANSSON, LENNART**

72 Inventor/es:  
**Egelrud, Torbjörn y**  
**Hansson, Lennart**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 369 659 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Ratones transgénicos SCCE y su uso como modelos de enfermedad humana

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a embriones de ratón y ratones scce transgénicos, su uso como modelos de estudio de enfermedades humanas, a métodos de uso de estos modelos para identificar compuestos y composiciones eficaces para el tratamiento de estas enfermedades. En particular, la invención se refiere a ratones transgénicos que sobreexpresan un gen scce en la epidermis. Estos animales de modelo presentan un cambio principal en el fenotipo caracterizado por un trastorno cutáneo grave y son útiles para identificar compuestos y composiciones para el tratamiento de diversas enfermedades humanas.

10 Antecedentes generales

15 La piel como órgano es de interés desde los puntos de vista biológico, médico y cosmetológico. Existe un gran número de enfermedades cutáneas que o bien son específicas de órgano, por ejemplo psoriasis y eccemas, o bien son manifestaciones de una enfermedad general, tal como reacciones alérgicas generales. El hecho de que existen enfermedades específicas de la piel puede considerarse una prueba de la existencia de mecanismos moleculares que son únicos para la piel. Análogamente, estudios sobre procesos moleculares específicos de la piel son de importancia para el entendimiento y tratamiento de trastornos cutáneos. Parece razonable asumir que varios de estos procesos de una manera u otra están relacionados a la función más especializada de la piel, que es la formación de una barrera fisicoquímica entre el exterior y el interior del cuerpo. La barrera cutánea fisicoquímica se ubica en la capa más externa de la piel, el estrato córneo.

20 El estrato córneo es la estructura más especializada de la piel. Es el producto final del proceso de diferenciación de la epidermis, que es el epitelio escamoso estratificado que representa la parte más externa de la piel. La mayoría de las células de la epidermis consisten de queratinocitos en diversos estados de diferenciación. Los queratinocitos más bajos, las células basales, residen en una membrana basal en contacto con la dermis, que es el tejido conjuntivo de la piel, y son los únicos queratinocitos que tienen capacidad de división. Una fracción de las células basales abandona continuamente la membrana basal y experimenta un proceso de diferenciación, que eventualmente hace que las células se vuelvan bloques de construcción del estrato córneo. En este proceso los queratinocitos experimentan varios cambios adaptativos. Existe un contenido aumentado de citoesqueleto que consiste de citoqueratinas específicas de la epidermis. Los filamentos intermedios de células contiguas se unen a una unidad funcional mediante un número aumentado de desmosomas. Los cambios más drásticos tienen lugar durante la transición de la capa de células vivas más superior, el estrato granuloso, al estrato córneo no viable en un proceso habitualmente denominado queratinización. Proteínas reticuladas covalentemente se depositan cerca del aspecto interno de la membrana plasmática, formando una envoltura de célula muy resistente. Además se secreta una sustancia rica en lípidos, que se origina en un orgánulo celular específico de queratinocitos, al espacio extracelular y, mediante la formación de láminas de lípidos, que rodean las células del estrato córneo, constituye la barrera de permeabilidad frente a sustancias hidrófilas. Finalmente desaparecen todas las estructuras intracelulares excepto los filamentos de citoqueratina empaquetados densamente.

40 Por tanto, las células del estrato córneo, los corneocitos, no son viables. Esto significa que la regulación de diversos procesos en el estrato córneo debe ser el resultado de una "programación" en un estado en el que los queratinocitos todavía son viables. Se finaliza la renovación de la epidermis, que normalmente avanza en aproximadamente cuatro semanas durante las cuales las células son parte del estrato córneo durante aproximadamente dos semanas, por medio del desprendimiento de células de la superficie cutánea en el proceso de descamación. Este proceso es un ejemplo de "programación" del estrato córneo. Un prerrequisito para la función del estrato córneo como barrera fisicoquímica es que sus células individuales se mantengan juntas mediante estructuras mecánicamente resistentes, que son desmosomas. La degradación de los desmosomas, que es un prerrequisito para la descamación, debe regularse de modo que se produzca un desprendimiento de células de la superficie cutánea que equilibre la producción *de novo* del estrato córneo sin interferir con las funciones de barrera del tejido.

#### *Trastornos de queratinización*

50 En un gran número de estados patológicos en la piel de diversa gravedad, existen alteraciones en el proceso de queratinización. En la psoriasis existe, además de una inflamación crónica típica, sobreproducción de un estrato córneo inmaduro da como resultado las escamas típicas de esta enfermedad. Existe un grupo de enfermedades cutáneas heredadas caracterizado por un estrato córneo engrosado que conduce a la formación de "escamas de peces", la denominada ictiosis. En varias de las ictiosis existe una tasa de descamación disminuida. Aunque menos grave que la ictiosis, la "piel seca" (xerodermia) también se caracteriza por un estrato córneo del cual se desprenden los corneocitos, no como en condiciones normales como células individuales o como pequeños agregados de células, sino como grandes escamas macroscópicamente visibles. Este trastorno es muy común entre ancianos y

entre individuos atópicos, es decir individuos con una resistencia aumentada frente a agentes irritantes cutáneos y una disposición para desarrollar una forma característica de eccema endógeno. En las enfermedades del acné existe una queratinización alterada en los conductos de las glándulas sebáceas, que conduce a la formación de comedones y taponamientos. La formación de comedones precede a, y se cree que provoca, la lesión de acné inflamatoria. Las enzimas proteolíticas están implicadas en la queratinización.

Existen varias fases en el proceso de queratinización y durante la renovación del estrato córneo en el que las enzimas proteolíticas parecen desempeñar papeles importantes. Ciertamente la desaparición de todas las estructuras intracelulares excepto los filamentos de citoqueratina que se produce durante la transición entre capas epidérmicas cornificadas y viables, debe implicar proteólisis. La transformación de profilagrina a filagrina, una proteína que se cree que funciona en el tipo especial de agregación de filamentos de citoqueratina durante la queratinización, puede catalizarse mediante una proteinasa específica. En el estrato córneo la filagrina se degrada adicionalmente en componentes de bajo peso molecular que son importantes probablemente como "humectantes naturales". Además existen modificaciones proteolíticas de polipéptidos de citoqueratina durante el proceso de queratinización. Finalmente, es probable que acontecimientos proteolíticos desempeñen papeles cruciales en la degradación de estructuras de cohesión intercelular en el estrato córneo en procesos que conducen eventualmente a la descamación.

*Cohesión de células del estrato córneo y descamación. El papel de desmosomas*

La cohesión intercelular en el estrato córneo así como en las partes viables de la epidermis está mediada en un grado significativo por desmosomas. Un desmosoma consiste en dos mitades simétricas, cada una de las cuales está formada por dos células contiguas. Cada mitad desmosómica tiene una parte intracelular unida a los filamentos de citoqueratina y una parte compuesta por glicoproteínas ancladas intracelularmente y con partes extracelulares y transmembrana. Las partes extracelulares de estas proteínas, las desmogleínas, son moléculas de adhesión, y mediante su interacción entre sí en el espacio extracelular se forma una estructura de cohesión. La degradación de los desmosomas parece seguir vías algo diferentes en el estrato córneo de las palmas y las plantas de los pies en comparación con estrato córneo no palmo-plantar. En este último tejido aproximadamente el 85% de los desmosomas desaparecen poco después de que las células se vuelvan completamente cornificadas. Los desmosomas restantes, que están preferiblemente ubicados en los bordes vellosos de las células extremadamente aplanadas, permanecen aparentemente intactos hasta el nivel en el que tiene lugar la descamación. En el estrato córneo palmo-plantar los corneocitos están mucho menos aplanados, y no existe degradación exhaustiva de los desmosomas en capas más profundas del tejido. En ambos tejidos la descamación está asociada con la degradación desmosómica. En la piel ictiósica así como en la "piel seca", se ha mostrado que aumenta el número de desmosomas en las capas superficiales del estrato córneo.

Muchos de los mecanismos moleculares específicos de tejido de la piel están asociados con la formación y renovación de la capa más externa que forma la barrera de la epidermis, el estrato córneo, que consiste de células epiteliales cornificadas rodeadas por lípidos altamente organizados. El estrato córneo está formándose continuamente en el proceso de diferenciación epidérmica. En los esfuerzos por entender los mecanismos mediante los cuales se mantiene un espesor constante del estrato córneo por medio de una descamación continua de las células superficiales, se han identificado dos serina proteasas humanas, enzima quimotriptica del estrato córneo (SCCE) y enzima triptica del estrato córneo (SCTE) (Hansson *et al.* 1994 y Brattsand *et al.* 1999). La clonación y la expresión de la SCCE se describe en el documento WO95/00651, y en el documento US-A-5834290. Ambas enzimas pertenecen al grupo calicreína de serina proteasas, cuyos genes se ubican a un tramo corto en el cromosoma 19q13.3-19q13.4 (Diamandis *et al.* 2000). SCCE es sinónimo con calicreína 7 humana (KLK7). Debe observarse sin embargo, que la numeración de calicreínas no es consistente entre especies. La expresión de SCCE y SCTE parece estar limitada a epitelios escamosos que se someten a cornificación y en los que existe una necesidad de descamación (Ekholm *et al.* 2000).

Enfermedades cutáneas inflamatorias comunes pueden dar como resultado un impedimento grave provocando función reducida, estigmatización, y síntomas sensoriales casi insoportables. Un síntoma dominante de muchas de estas enfermedades es el picor, que en muchos casos puede ser extremadamente problemático, provocando alteraciones graves en muchos aspectos de vida cotidiana y patrones de sueño de las personas que lo padecen. En la dermatitis atópica, que afecta a más del 10% de los niños en algún punto de su infancia, el prurito es un criterio de diagnóstico principal y siempre está presente en la enfermedad activa. Incluso se ha establecido que la "dermatitis atópica es un picor que cuando se rasca erupciona", y que el "prurito debe considerarse una característica esencial de la dermatitis atópica" (Beltrani, 1999). Los mecanismos de picor se entienden escasamente, y los tratamientos disponibles son con frecuencia insatisfactorios. Esto puede deberse, al menos en parte, a la falta de modelos animales satisfactorios (Greaves y Wall, 1996).

En enfermedades cutáneas inflamatorias tales como la psoriasis y la dermatitis atópica la evidencia en favor de un papel central del sistema inmunitario en la patogénesis es abrumadora. Parece probable que el desarrollo de los diversos signos y lesiones cutáneas específicas de la enfermedad sean el resultado de interacciones al nivel celular y molecular entre el sistema inmunitario y moléculas y estructuras derivadas de la piel. En la mayoría de estudios

dirigidos al entendimiento de estas interacciones, se ha centrado la atención en citocinas, factores de crecimiento, y moléculas de adhesión. Aunque muchos de estos componentes se producen mediante células cutáneas, no son únicos para la piel, sino que están presentes de manera más o menos general en células y tejidos en todo el organismo. Este hecho puede provocar problemas en por ejemplo el desarrollo de terapias específicas de la piel. La situación sería diferente si se encontrara una molécula o estructura realmente específica de la piel con un papel central en la fisiopatología de enfermedades cutáneas inflamatorias. La presente invención presenta nuevas evidencias de que la serina proteasa enzima quimotriptica del estrato córneo (SCCE) puede pertenecer a esta categoría de moléculas específicas de la piel.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a resultados de estudios dirigidos a la dilucidación de la posible participación de una de estas proteasas, SCCE, en patología cutánea. Se caracterizaron los genes *scce* murinos y humanos, y se produjeron ratones transgénicos que sobreexpresan ARNm de *scce* humano. Los únicos cambios fenotípicos macroscópicos observados en estos animales se encontraron en la piel, que mostró cambios histológicos con varias similitudes con los observados en enfermedades cutáneas inflamatorias tales como en las fases crónicas de dermatitis atópica en seres humanos. Además, los ratones transgénicos mostraron signos de picor grave. También se encontraron evidencias de sobreexpresión de SCCE en lesiones crónicas de dermatitis atópica en seres humanos lo que corresponde a lo que se ha mostrado recientemente en psoriasis (Ekholm *et al.* 1999). Tomados en conjunto, los resultados dan soporte a la idea de que la SCCE y enzimas relacionadas pueden participar en la fisiopatología de enfermedades cutáneas inflamatorias con picor, y por tanto que la SCCE puede ser una posible diana para estrategias de tratamiento específicas de órgano. Los ratones transgénicos de la invención pueden proporcionar un nuevo modelo para estudios adicionales de mecanismos de picor y las pruebas de posibles compuestos y composiciones para mitigar diversas enfermedades cutáneas en las que el picor es un componente.

Se aisló el gen de la SCCE humana de una biblioteca genómica de leucocito humano, n.º de cat. HL 1111 j n.º de lote 3511 (Clontech, CA) usando sondas de ADNc derivadas de ADNc de *scce* humano. Se aislaron clones solapantes y se secuenció el gen estructural completo mediante secuenciación de ADN automatizada y se analizó mediante ABI377 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). La secuencia completa puede encontrarse usando el número de registro de Gene Bank AF 332583.

Tabla 1 SCCE humana [org=*Homo sapiens*] gen de la enzima quimotriptica del estrato córneo de *Homo sapiens* (SEQ ID NO: 3).

**TACCACATTTTCTTAATCCAGTCTATCACTGATGGACATTTAGGTTGATTCCCTGTGTTTGCTGTTGT  
 CAATAGTTCTACAATGAACGTACGTGTCCATGTGTCTTTAAACAGAATGATTTATATTCCTTTGGGTA  
 CACACACTGGGGCTTATGAGAGGGTGGAGAGTGGGAGGAAGGAGAGGATCAGAAAAAATAACTA  
 ATGGGTACTAGGCTTAATACCTGGGTGATTAAATAATCTGTATAACAAACCCCATGGCGCACGTTT  
 ACCTACGCAACAAACCTGCACATCCTGCACATGTACCCCGAACTGAAAAGTTAAAAAAGAAAAAT  
 AAATATTTGCTTATAAATAAATAAATGAAGCCCTCAAAAATGTTCTATTAGATAATGTTAAGTACAGA  
 CATTTTTGTTATAAATAACATAATATACAAAGAAATCTATGTATAACATGATTAATGACCATAAGAA  
 CATAGATCCTAAACATGGCAAATATTAGTGGGGTGGGGTTAGGGAAAGCGTTGTTTTAACTTACA  
 CCTCTCTGTTAGAGTTGGGAATGGGTTTAGGCGTAATTACAGGCACGACTGGGATCAGCTTGGACA  
 AGTTCCCCCAGGCGGGCCAGAATTAGGATGTAGGGTCTAGGCCACCCCTGAGAGGGGGTGAGGG  
 CAAGAAAATGGCCCCAGAAGCCGGGCGCAGTGGCTCACGCCTGTAATCCCAGCACTTTGCGGGGC**

30

CGAGGCGGGCACATCATGAGGTCAGGAGATCGAGACCATTCTGGCCAACATAGTGAAACCCGGTC  
 TCTACTAAAAATACAAAAATTATCTGGGAGTGGTGGTGCCTGTAATCCCAGGTACTCGGGAG  
 GCTGAGGCAGGAGAATCACTTGAACCTGGGAGGCGGAGCTGGCAGTGAGCCGAGATCGCGCCAC  
 CGCACTCCAGCCTGGCGATAGAGAGAGACTCCATCCAAAAAAGAAAGGAAGGGAGGGAGGGA  
 GGAGGGAAGAAAGAAAGAAAACCGCCCCAGAGAAGGACCCGAGCCAGAGCCTATTCTCTGAGCTC  
 AGCGACTGCTTGAATCCCCTCCTGCCCTCAGACCCAGCGCACCCGGTCCCTCCCCGAGAGCA  
 GCCAGGAGGGACTGTGGGACCAGAATGTGCGGGGGCGCAGGAGCTGGGCACCGCCCGTCCTTCG  
 GAGGGAGGGTGGAGAGAGAGTGCAGTGGTCCAATTGCTCTCGCTGCGTCAGGGTTCCAGATAAC  
 CAGAACCGCAAATGCAGGCGGGGGTGTCCAGAGTCGGCTCCGCCTGCACCCAGGGCGCTGGG  
 GCCGGGCATGGGGCGGGGGTGTATAAGAGGACGGCCAGCAGAGGGCTGAAGATTTTGGAGC  
 CCAGCTGTGTGCCAGCCCAAGTCGGAACCTGGATCACATCAGATCCTCTCGAGGTGAGAAGAGGC  
 TTCATCAAGGGTGCACCTGTAGGGGAGGGGGTGTGCTGGCTCCAAGCCTGACTCTGCTCTCGAG  
 AGGTAGGGGCTGCAGCCTAGACTCCCGTCTGAGCAGTGAGGGCCTGGAAGTCTGCAATTTGGG  
 GCCTTTTAGGGAAAACGAACTACAGAGTCAGAAGTTTGGGTTCCACAGGGAAGGGCAAGATCGG  
 AGCCTAGATTCTGGGTCTCTAGGGATCTGAAGAACAGGAATTTTGGGTCTGAGGGAGGAGGGC  
 TGGGGTTCTGGACTCCTGGGTCTGAGGGAGGAGGGCCTGGGGCCTGGACTCCTGGGTCTGAGG  
 GAGGAGGGGCTGGGGTCTCGACTCCTGGGTCTGAGGGAGGAGGGGCTGGGGCCTGGACTCC  
 TGGGTCTGAGGGAGGAGGGGCTGGGACCTGGACTCCTAGGTCTGAGGGAGGAGGAGCTGGGGC  
 CTGGACTCCTGGGTCTGAGGGAGGAGGGGCTGGGGCCTGGACTCCTGGGTCTGAGGGAGGATGG  
 GCTGAGGCCTAGACTCCTGGGTCTGAGGGAGGAGGGGCTGGGGCCTGGACTCCTGGGTCTGAGG  
 GAGGAGGGGCTGGAGCCTGGACTCCTGGGCCTGAGGGAGGAGGGACTGAGACCTGGACTCCTAG  
 GTCTGAGGGAGGAGGGACTGGGACCTGGACTCCTGGGTCTGAGGGAGGAGGAGCTGGGGCCT  
 GGACTCCTGGGTCTGAGGGAGGCGGGGCTGGGGCCTGGACTCCTGGGTCTGAGGGAGGAGGG  
 GTTGGGGCCTGGACTCCTGAGCCTGAGGGAGGAGGGACTTGGACCTGGACTCCTAGGTCTGAGG  
 GAGGAGGAGCTGGGGCCTGGACTCCTAGGTCTGAGGGAGGAGGGGCTGGGGCCTGGACTCC  
 TGGGTCTGAGGGAGGAAGGTGCTAGGGTCTGGACTCTTGGGTATGAGGGAGGAGGAGGTTAGGG  
 GTCTGGACTTCTGAGTGTAAAGGAAGGAGAGGCCAGAGAAAGGAATTTCTGGGTCTGAGGGAGGAG  
 GGGCTGGGGTTCTGGACCCCTAGGTCTGAGGGAGGAGGGGCTGGGGCCTGGACTCCTGGGTCTG  
 TGGGGGAGGGGCTGGGGCCTGGACCCCTGGGTCTGAGTGGGGAGGGGCTGGGCCTGAATGCT  
 TTCTCCTTCTCAGCTCCAGCAGGAGAGGCCCTTCTCGCCTGGCAGCCCCTGAGCGGCTCAGCAG  
 GGCACCATGGCAAGATCCCTTCTCCTGCCCTGCAGATCCTACTGCTATCCTTAGCCTTGAAACT  
 GCAGGAGAAGAAGGTGAAAGCTGGACTGGGAAGTCTGACCTCACCTCAGGGCCCCACTGACCCT  
 CTCAAAGGAGTCCCTGAGTCAGAACCTTCCCTCCTCAAACAGCTTCCATCCTGGGAGGACCAGAC  
 TGTCGGCTGAAGCCCCGCTCTCCTGCTTCTGCTGACTCAGGGGGTCTCTGTCCCCTCCAGGCC  
 TGCCTCCTGTGCTCAGGGTCTCTGTGGTCCCCAGATGAGATGCGCCTCCTGGGTTTCTGAGTG  
 GGCTCCTTCTGTCTGTCTATCCCTATCTTGTCTTCTCTGTATTTCTCCACACATTTTCATCTGTC  
 TCTGTCCATCTCTGACTCTGGGAATCCCTGAGGTGCAGCCTCAGCCTTCCCCTAATGCTAGCTACCC  
 ACATGCTCCTCCATGTCTCCATCCAGCCCAGGGTGACAAGATTATTGATGGCGCCCCATGTGCAAG  
 AGGCTCCCACCCATGGCAGGTGGCCCTGCTCAGTGGCAATCAGCTCCACTGCGGAGGGCGTCTGG

TCAATGAGCGCTGGGTGCTCACTGCCGCCACTGCAAGATGAAGTAGGTGCCACCCAAGTCTCTG  
CTGGAGGTGCGCCAGCATCTCCAGCTCGCTATGGGGGTGGAAGGGCAGTCTTTCTGTGCCTACGG  
CTCTATTCTCCTCTCTCTGGGTCTCTGTCCCCCTCTCTCTGGGCCTCTGTACCCCCTCTCCCTGGGG  
CTCTGTCCCCCTCTCTCCCTGGCTCTCTGTCTCCCTCTCTCTGGGTCTCTGTCCCCCTCTCTCTGGA  
TCTCTGTTCCCCTCTCTCTGTGTCTCTGTCCCCATTCTCTCTAGGTCTCTGTTCCCCTCCTCTCTC  
TCTGGGTCTCTGTCCCTCTCTCTGGTCTCTGTCCCCCTCTCTCTCTGGATCTCTGTCCCCCTCTCC  
CTGGGCCTCTGTACCCCCTCTCCCTGGGGCTCTGTCCCCCTCTCTGGGTCTCTGTCTGCCTTTCTC  
TCTGGATCTCTGTTCCCCTCTGTGTCTCTGTCCCCCTCTCTCTCTGGGTCTCTGTTCCCCTCCTCTC  
TTTCTGGGTCTCTGTCCCTCTCTCTCTGGGTCTCTGTCCCCCTCTCTCTCTGGTCTCTGTTCCCCTC  
CTCTCTCTCTGGTCTCTGTCCCTCTCTCTCTGGGTCTCTGTACCCTCTCTCTCTGGGTCTCTGTAC  
CCTCTCTCTCTGGTCTCTGTTCCCCTCCTCTCTCTGTGGGTCTCTGTCCCTCTCTCTCTGGGTCTCT  
GTTCCCCTCTCTCTCTGGTCTCTGTTCCCCTCCTCTCTCTCCGGATCTCTGTCCCCCTCTCCCTGG  
GGCTCTGTCCCCCTCTCTCCCTGGCTCTCTGTCTCCTCTCTCTGGGGCTCTGTCCCCCTCTCTCTC  
TGGTCTCTGTTCCCCTCTCTCTGGGTCTCTGTCCCTCTCTCTCTGGGTCTCTGTCCCTCTCTCTCTG  
GATCTCTGTCCCCCTCTCCCTGGGCCTCTGTACCCCCTCTCCCTGGGGCTCTGTCCCCCTCTCTCTG  
GGTCTCTGTCTGCCTTTCTCTCTGGATCTCTGTTCCCCTCTGTGTCTCTGTCCCCCTCTCTCTCTGG  
GTCTCTGTTCCCCTCCTCTCTTTCTGGGTCTCTGTCCCTCTCTCTCTGGGTCTCTGTCCCCCTCTCT  
CTCTGGTCTCTGTTCCCCTCCTCTCTCTCTGGTCTCTGTCCCTCTCTCTCTGGGTCTCTGTACCCT  
CTCTCTCTGGGTCTCTGTACCCTCTCTCTCTGGTCTCTGTTCCCCTCCTCTCTCTGTGGGTCTCT  
GTCCCTCTCTCTCTGGGTCTCTGTTCCCCTCTCTCTCTGGTCTCTGTTCCCCTCCTCTCTCTCCGGA  
TCTCTGTCCCCCTCTCCCTGGGGCTCTGTCCCCCTCTCTCCCTGGCTCTCTGTCTCCTCTCTCTGG  
GGCTCTGTCCCCCTCTCTCTCTGGTCTCTGTTCCCCTCTCTCTGGGTCTCTGTCCCTCTCTCTCTGG  
GTCTCTGTCCCTCTCTCTCTGGATCTCTGTCCCCCTCTCTCTCTGGGTCTCTGTTCCCCTCTCTCTGG  
GTCTCTGTCCCCCTCCTCTCTCTGTGTCTCTCTCCCCCTCCTCTCTCTGTGTCTCTGTCCCCCTCC  
TATCTCTGTGTCTCTCTCCCCCTCCTCTCTCTGGGTCTCTGTCCCCCTCTCTGGGTCTCTGTCTC  
CCTCTCTCTGGGGCTCTGTCCCCCTCTCTCTCTGGATCTCTGTTCCCCTCTCTCTGGGTCTCTGTCT  
CCCCTCCTCTCTCTGTGTCTCTGTCCCCCTCCTCTCTCTGGGTCTCTGTCCCCACCCCGTCCCCCA  
GGTCTTTGCACACCCTCTCTGTACAGTGTCTTTCTGAATCTGTGAATGTCACTCCTCGCAGTGAG  
TACACCGTGACCTGGGCAGTGATACGCTGGGCGACAGGAGAGCTCAGAGGATCAAGGCCTCGAA  
GTCAATCCGCCACCCCGGCTACTCCACACAGACCCATGTTAATGACCTCATGCTCGTGAAGCTCAAT  
AGCCAGGCCAGGCTGTCATCCATGGTGAAGAAAGTCAGGCTGCCCTCCCGCTGCGAACCCCTGG  
AACCACCTGTA CTGCTCCGGCTGGGGCACTACCACGAGCCAGATGGTAGGTGGCCTCAGTGAC  
CCAGGAGTGACAGGCCCCAGCCCTCCTCCCTCAGACCCAGGAGTCCAGGCCCCAGCCCTCCTCC  
CTCAGACCCAGGAGTCCAGGCCTCAGCCCCTCCTCCCTCAGACCCAGGAGTCCAGGCCCCAGCC  
CCTCCTCCCTCAGACCCGCGAGTCCAGACCCAGCCCTCCTCCCTCAGACCCAGCAGTCCCTGGGC  
CCCAGACCCTCCTCCCTCGGAACCAGGAGCCTGAACAACAGCCCTTCTGGTCTCTGCCCCCATCCT  
CTCTGACTGACAGCTCTCCCTGCTCCTCCCTGCAGTGACCTTTCCCTCTGACCTCATGTGCGTGGAT  
GTCAAGCTCATCTCCCCCAGGACTGCACGAAGGTTTACAAGGACTTACTGGAAAATTCCATGCTG  
TGCGCTGGCATCCCCGACTCCAAGAAAAACGCCTGCAATGTGAGACCCTCCCCCCCAATTCCTCCC

CAGTCCTGGGTACCCTGTCTGCATGCCCCAGGGACAGAGCTTGACCCAAGTGA CTGGGTACCAAG  
 CCCGGCCTTGCCCTCCCCCAGGCCTGGCCTCCTCAGCTTTTCCACCTCATTCTCTGCCTAGGTCA  
 GGGGTGGGAGTTTACTTAGGGGCCGATGTGGCCCTGGGGATGGGACAGAGAGTTAATAGGGGT  
 GAGAAAGTGGGGGTGGGACCAGGGAAGGAGACTGAGGTGCTGGCCTCAGGCCCAAACCCTAAGG  
 GGGCACCAAAAACCTCAGTGATTGAGATAAATCATAATGCAATATTTAAAAATAAAAATAAAAAC TC  
 ATGCAGAAGTCCATGATGGACAAAATGTCACATTTTAAATAAAGAGCAGGTGGATCTTACTGAATTT  
 TCCCTTGCCGTAAGTACTAGCGTGGCTCAGCACAGCGCTGTA CTGGCACTGTCTTCATTTAAATGT  
 GGATACCATGCCATCATGCAGTTTTATGTATTACATTTGATTTTCGTTAAGTACTGCATTGAAGTATT  
 GTGTATTGCAGTTACTGAGATTTTGTGCCTGAAGCTGATGACTCACTCACCTGACCCTGGCCCTGG  
 TCCCGGGGAAAACACTCTTCTCTCCACCTCCTCTCTGTTCCTCTTCTGGCCTTTTGTATCCCCT  
 CTGTTTCTGAACAGTCTTCCACATCTCTCTTTGTGACATAATTTCAATTCATTCTTTTCTCTTTGTT  
 TTTTCTCTGTGTTGAGCTAGCTTGCTCTCCCTCCCTGTTCTCTCTCCATGCCCTCCTCTCTGCTCTC  
 TGTCTTCTCCCTCTTCTCTTGTCTCTCTCTCTCTCTCCCTCCCTCTCTCTCTCCCTGCCCCCT  
 GCTCTCTTTTTTCTCTCTCTCTGTCTCCTCTCTGGCCCTCTCCTCTTCTCTCTCTCCCCACTTC  
 TCTGTCTCTTTCATCTCTCTCCCTCATCTCTCCTTGCCCCCTCCTTTTTACTGTCTCTCTTTTCTCT  
 TTCTTCTATCTCTCTCCTCTCCCCGCCGCTCCCCCATCTCTGTCTTTCTTCTCTCTCTTTATTCTCT  
 CCTCTCTCCAGTCTCTCTCTCCTCTCCCCACCCCCACCCCATCTCTCTCCCCACACCTTCCCCCCT  
 TTCTCTTTGTCTCTCTCTTCTACCTCTTCTTCTCCACCCCCATCTCTCTCTCTCTTCTCTTCCCACAC  
 CCTCCCCATCTCCCTCATCTCTTTGTCTGTCTCTCTTCTCCCTCCTTCTTTTCCACCCCCATCTCTCTG  
 TCTCTCTCTCTCCCCATACCTTTCCCTCTTCTCATCTCTCTTTGTCTCTCTCTCTCTTTCCTCTTTC  
 TTCTCCACCTCCAACCTCTCTGTCTCTCCACCCCATCCTCCTTGCTCACATCTGCACCTCAGCTG  
 TCAGGGGATGTGGGATGGTGAGTGTTAGGGATAGAGGAGATGGGAGAGAGATGACTGTCCTAGA  
 GAATAGGGTGTTCCCTTCTCCCTGGTGAGGGCCAGTTTCATGAATGTGCAAGCTCTGCACGGAC  
 ACAGAGCCCCCACTCAGAAGGGTCTCAAACCTAGTCTAATGCATTCTGCTGTTGTCTTGAAATTC  
 TCAATAATTTTTGAACAAAGGGCCCTGCATTTTCGTTTTGCACCAAGTCTGTA AATTATGTAAC TGG  
 TCTTACCCTGGTCTCCGAGACCATCGTGTCCTTCTGCGCCACAGGGCAGCATCCACCCC  
 TTGGAGATGATGTTCTTCTCCCACTAGCTTGGAGCAGGGTCCTTAACATTGGAAAATAAAGAGTG  
 CTCTGATCCTGGAAGCCCCACCCCTTCTCTGCAATTGGTCTCATTGGCCAAGGGTCAAACCAGTGT  
 CTTCAAAGGACCTAGTGTGTCCCTAGCACTAGCTCTCCATTAGTCCCAGAGACAATGAGTCTCTT  
 CTCATTGGCTATGGTGGAAGTCCATAATCTGCAAGACAAAGACCGATAACTGAGGAATGTATGAGA  
 ATGAGTTGGGCTTTGATCTGAAGCCAAAGTTAATCTCCGGCTCTATTCCTCTAGGGTGA CT CAGG  
 GGGACCGTTGGTGTGCAGAGGTACCCTGCAAGGTCTGGTGTCTGGGGA ACTTTCCCTTGCGGCC  
 AACCCAATGACCCAGGAGTCTACACTCAAGTGTGCAAGTTCACCAAGTGGATAAATGACACCATGA  
 AAAAGCATCGCTAACGCCCACTGAGTTAATTA ACTGTGTGCTTCCAACAGAAAATGCACAGGAGT  
 GAGGACGCCGATGACCTATGAAGTCAAATTTGACTTTACCTTTCTCAAAGATATATTTAAACCTCA  
 TGCCCTGTTGATAAACCAATCAAATTGGTAAAGACCTAAAACCAAAAACAAATAAAGAAACACAAAAC  
 CCTCAGTGCTGGAGAAGAGTCACTGAGACCAGCACTCTCAAACACTGGA ACTGGACGTTTCGTACA  
 GTCTTTACGGAAGACACTTGGTCAACGTACACCGAGACCCTTATTCACCACCTTTGACCCAGTAACT  
 CTAATCTTAGGAAGAACCTACTGAAACAAAAAAATCCAAAATGTAGAACAAGACTTGAATTTACCA

TGATATTATTTATCACAGAAATGAAGTGAAACCATCAAACATGTTCCAAAAGTACCAGATGGCTTAA  
ATAATAGTCTGGCTTGGCACAACGATGTTTTTTTTCTTTGAGACAGAGTCTCTGTTGCTTGGGCTGC  
AATGCAGTGATGCAATCTTGGCTCACTGCAACCTCCGCCTCCTGGGTTCAAGTGATTCTCGTGCTTC  
AGCCTCCCAAGTACCTGGGACTACAGGTGTGCACCACCACACCAGGCTAATTTTTTGTGATTTTTTA  
CTAGAGACAGGGTTTCACCATGTTGGCCAGCGTGGTCTTGAACGCCTGACCTCAGATGATCCACCC  
ACCTTGGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGCATGAGCCACCACGGCCAGCCCACAATGATATTA  
CAAACCTATTA AAAATGATACTTAGACAGAATTGTCAGTATTATTCAAGAACATTTAGGCTATAGGAT  
GTTAAATGACAAAAGGAAGGACAAAATATATATGTATGTGACCCTACCCATAAAAAATGAAATATT  
CACAGAATCAGATCTGAAAACACATGTCCAGACTGCATACTGGGGTCGTCATGAGGTGTCTCCTT  
CCTTCTGTGTA CTTTTCTTGAATGTGCACTTTTATAACATGAAAAATAAAGGTGGGGAAAAAAGTC  
TGAAGATCTAAGATTGGAGAGAGGTGACCTTTCAGGAAGGGAGACTAGAAAGAAATATGTGCCTG  
GTTTTGAGCCCTGGTCTGCCGGCCCTGTTCCAGGGCATATTTCCATTTCCAGATCTCAGTTTTTC  
CTGTCTGTAAAATGGGAGAGAGAGGAAAGGATGGAGAGAGGAAGAAGGAAGGGAGGAGGGAGG  
AGAGAACAGGCCAACTTCATCAGCGTGGGAAGGGGTGTGAAAGTGTCTGAGCATCTCACGAGT  
GACAAGTGAGGAGGGAGGCTGGCGGTTTTTCAGAGGGATTGGGATGACAGTAGACAGGACACAGG  
GGTCCACAGGGGTCTGCCAGAAGTAAGCAAACAGTGCCGGAGGAAGATGGTGGCACCTGCTCCC  
CAAGAAGGGAGGGAAAGGAACCTCGGGAAGCGGGTAGGATGAGGGAGGAGTCCTCTGTGACTCA  
GAGCCTGGCCACAGCCCCAGCCATCTAACATCAAAGATCCTCTGTGTGGTCACACCTCAGACGCTG  
CTGACCGAGGAGCCACTCCAGCCCAGGACACGCCCTCCTACCTGTTCTTCTGTTTTTCTCCCAGA  
ATTC

5 Para aislar el gen *scce* murino se usaron sondas de ADNc derivadas del ADNc de *scce* murino (Bäckman et al. 1999) para seleccionar y aislar clones de una biblioteca genómica de 129SVJ-Lambda Fix II, n.º de cat. 946306 (Stratagene, La Jolla, CA). Se determinó la secuencia del gen completa y se analizó tal como se describió anteriormente. La secuencia completa puede encontrarse usando el número de registro de Gene Bank AF 339930.

Las secuencias de aminoácidos (tal como se dedujeron a partir de ADNc) de la SCCE humana y murina muestran aproximadamente el 80% de similitud (Hansson et al. 1994 y Bäckman et al. 1999).

10 La organización genómica de los genes estructurales *scce* murino y humano se muestran esquemáticamente en la figura 1. La diferencia más evidente entre los genes estructurales de las dos especies es que los intrones son más largos en el gen *scce* humano. Tal como se observa en la figura 1 los genes *scce* de ser humano y de ratón contienen ambos seis exones, aquí indicados como recuadros negros, y tienen el inicio de la traducción ubicado en el exón 2, y el codón de terminación en el exón 6. En general la organización de las estructuras exón-intrón de los dos genes es similar pero debido a intrones más cortos, el gen murino es más pequeño, de aproximadamente 4kb en comparación con 8 kb. En el gen humano, el sitio de iniciación de la traducción se encuentra a 60 nucleótidos en el sentido 3' del extremo 5' de exón 2, y una posible caja TATA aproximadamente a 35 pb en el sentido 5' del exón 1. De manera similar, el codón de iniciación murino está colocado dentro del segundo exón, a 39 nucleótidos en el sentido 3' de la unión intrón-exón.

20 Para generar ratones transgénicos con una regulación de expresión modificada en comparación con el *scce* endógeno, se construyó el gen *scce* humano recombinante bajo el control del elemento promotor y potenciador temprano de SV40 tal como se describe en el ejemplo 2. Se obtuvieron tres fundadores que mostraron ser transgénicos para SV40e-*hscce* integrado en un solo sitio y se establecieron líneas mediante cruce adicional en ratones C57BL/6JxCBA. Tal como se esperaba, la caracterización inicial de las tres líneas reveló diferencias muy grandes en niveles de expresión de *scce* recombinante (véase más adelante). En la línea n.º 1010, que tiene los más altos niveles de transcrito de *hscce*, eran evidentes anomalías cutáneas, mientras que en las otras dos líneas no podían observarse cambios cutáneos u otras desviaciones fenotípicas macroscópicas. Para estudios comparativos detallados adicionalmente de los transgénicos n.º 1010 una de las líneas con fenotipo aparentemente normal (n.º 107) y miembros de la camada no transgénicos se incluyeron como controles.



La importancia de la regulación transcripcional del gen *scce* recombinante se demostró mediante los resultados logrados a partir de otras variantes de modelos de ratón transgénico. En estos experimentos se insertaron diferentes elementos reguladores en el sentido 5' de un fragmento genómico que comprendía el gen estructural *scce* humano. Por ejemplo, se utilizó el promotor de queratina 14 humano/de ratón (Vassar *et al.*) con la idea de dirigir la expresión de *scce* recombinante hacia capas celulares más basales de lo que es la distribución normal para la SCCE endógena. Además, se sometió a prueba un fragmento genómico largo que contenía la secuencia reguladora en el sentido 5' de *scce* humano nativo incluyendo el promotor, y se evaluó. En estos experimentos los ratones transgénicos resultantes no mostraron ningún signo de morfología cutánea alterada ni signos de picor. El constructo detallado para la expresión de *scce* recombinante que comprende los elementos promotores y potenciadores tempranos de SV40 dio como resultado una distribución de expresión sorprendentemente limitada y un ratón transgénico que tenía cambios muy interesantes en la biología cutánea y signos claros de picor. Este patrón de expresión y fenotipo fueron sorprendentes puesto que las secuencias reguladoras tempranas de sv40 normalmente median la transcripción de alto nivel en células proliferativas mientras que aquí se observó la expresión más fuerte en queratinocitos diferenciados.

Según el conocimiento de los presentes inventores, este es el primer informe de un modelo de ratón para enfermedades cutáneas inflamatorias con picor producidas mediante manipulación genética de una enzima, que puede ser específica de la piel. Es probable que los ratones transgénicos SV40-*scce* den nuevas perspectivas en la fisiopatología de enfermedades cutáneas humanas con picor y proporcionen un nuevo modelo animal para el desarrollo de tratamientos dirigidos a una diana específica de órgano. A nivel de ARN, la expresión de la SCCE puede detectarse en varios órganos, aunque no a niveles comparables a la piel (Hansson *et al.* 1994 y Brattsand *et al.* 1999). En tejidos no malignos, hasta la fecha la proteína SCCE sólo se ha encontrado en células suprabasales altas en epitelios escamosos que se someten a cornificación y con una necesidad de descamación (Ekholm *et al.* 2000 y Ekholm *et al.* 1998). Los presentes inventores muestran aquí que la sobreexpresión de la SCCE en ratones en un sitio cerca a donde se expresa normalmente conduce a un estado que en cierta medida simula enfermedades cutáneas humanas comunes, con frecuencia debilitantes, tales como dermatitis atópica y psoriasis.

En ratones transgénicos SV40-*scce* con cambios cutáneos fenotípicos también se encontró la expresión de SCCE transgénica, de ARN así como de proteína, en otros órganos, especialmente intestino grueso y delgado, y pulmones. El hecho de que no se observaron cambios patológicos en estos órganos puede explicarse o bien mediante una resistencia o bien mediante una falta de respuesta a los efectos mediados por la SCCE, o bien mediante una falta de enzimas que activan la SCCE en órganos no afectados. La SCCE, humana así como murina, se produce como un precursor inactivo, que se convierte en proteasa activa mediante la escisión triptica en un sitio conservado (Hansson *et al.* 1994 y Bäckmann *et al.* 1999). Aún no se ha identificado la enzima responsable de la activación de la SCCE en la epidermis.

Los ratones transgénicos SV40-*scce* tienen un patrón de expresión algo inesperado de la SCCE en la piel. Puesto que el constructo de transgén contenía el promotor de SV40, se esperaba encontrar la mayor expresión en sitios con queratinocitos en proliferación, es decir en la capa basal de la epidermis y en folículos del cabello. Por el contrario, no se encontraron evidencias de la expresión de la SCCE en células basales. En su lugar, tal como se encontró mediante inmunohistoquímica, había expresión en células suprabasales, cuya intensidad aumentaba continuamente con la distancia desde la capa basal. Este patrón es similar al que se observa en lesiones de psoriasis (Ekholm *et al.* 1999) y lesiones crónicas en dermatitis atópica en seres humanos. Una posible explicación puede ser que el gen *scce* humano contiene elementos reguladores internos que suprimen su expresión en queratinocitos no diferenciados en la epidermis.

Siguen debiendo aclararse los mecanismos mediante los cuales la SCCE puede provocar una epidermis engrosada con hiperqueratosis, un infiltrado inflamatorio dérmico, y picor. Según la opinión actual el precursor de la SCCE se sintetiza en queratinocitos epidérmicos suprabasales altos y se almacena en cuerpos laminares ricos en lípidos. En el proceso en el cual un queratinocito terminalmente diferenciado se transforma de una célula viable en un corneocito, es decir un bloque de construcción de la capa superficial cornificada de la epidermis (el estrato córneo) el contenido de los cuerpos laminares, incluyendo precursor de la SCCE, se secreta en el espacio extracelular, en el que tiene lugar la conversión de pro-SCCE en proteasa activa (Sondell *et al.* 1995). Una posibilidad es que la SCCE, que se ha activado tal como se postuló, se difunde a través de la epidermis a las partes superficiales de la dermis, induciendo de ese modo el engrosamiento epidérmico así como inflamación dérmica y la activación de las terminaciones nerviosa que median el picor. En estudios previos sobre proteasas como posibles mediadores del picor se infectaron las enzimas por vía intradérmica en voluntarios humanos. La inyección de tripsina y quimasa de mastocitos provocó picor mediante un mecanismo que se cree implica la liberación mediante mastocitos de histamina, mientras que el picor provocado por calicreína inyectada vía intradérmica parecían estar mediado por un mecanismo que no implica histamina (Hägermark *et al.* 1972 y Hägermark (1974)). El tratamiento con un fármaco antihistamínico parecía no mitigar el picor observado en ratones transgénicos SV40-*scce* (A. Ny y T.Egelrud, observación no publicada). El hecho que la SCCE detectada mediante inmunohistoquímica en la piel de ratones transgénicos SV40-*scce* estaba limitado a partes superficiales de la epidermis sugiere que la inflamación dérmica y el prurito observado en estos ratones no eran efectos directos de la SCCE activa. Además, no se observaron signos de picor antes de la edad de aproximadamente 5 semanas, mientras que también se encontró sobreexpresión de la

5 SCCE en animales más jóvenes. Una explicación alternativa a los cambios y signos provocados por la sobreexpresión de la SCCE en la epidermis podría ser que una actividad proteolítica aumentada en la zona de transición entre capas epidérmicas viables y el estrato córneo puede conducir a la liberación de mediadores, que se difunden a otras partes de la piel en las que provocan cambios epidérmicos, inflamación dérmica, y prurito. Una tercera posibilidad es que la hiperqueratosis epidérmica y acantosis, inflamación dérmica y prurito son los resultados de respuestas adaptativas a un deterioro de la función de barrera del estrato córneo provocado por la degradación proteolítica aumentada de estructuras responsables de cohesión celular intercelular en la capa cornificada. La respuesta proliferativa de la epidermis podría ser un resultado o bien de un efecto directo de los mediadores liberados sobre queratinocitos o bien un efecto que es secundario a la inflamación dérmica.

10 Recientemente se describió una asociación directa entre una función de barrera epidérmica defectuosa y la proteólisis aberrante en un estado humano heredado con enfermedad cutánea grave. Se presentó fuerte evidencia de que las mutaciones causantes de enfermedad en el síndrome de Netherton se ubican en un gen que codifica un precursor de inhibidores de serina proteasa (Chavanas *et al.* 2000). Estos resultados, junto con los presentes resultados, sugieren que la actividad aumentada de serina proteasas en la piel pueden en efecto desempeñar un papel significativo en la fisiopatología cutánea. También pueden proporcionar incentivos para la exploración adicional de posibles principios terapéuticos nuevos para enfermedades cutáneas.

15 Por tanto la presente invención se refiere a un ratón transgénico que tiene integrada dentro de su genoma una secuencia de nucleótidos heteróloga que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína con una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 75% con respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2, en el que dicha proteína presenta actividad de la enzima quimotriptica del estrato córneo (SCCE), y en el que dicha secuencia de nucleótidos heteróloga está operativamente unida al promotor temprano de SV40.

La presente invención se refiere a un método para preparar un ratón transgénico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende las etapas de:

25 (a) construir y amplificar una secuencia de nucleótidos heteróloga que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína con una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 75% con respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2, en el que dicha proteína presenta actividad de la enzima quimotriptica del estrato córneo (SCCE), y en el que dicha secuencia de nucleótidos heteróloga está operativamente unida al promotor temprano de SV40,

30 (b) introducir dicha secuencia de nucleótidos heteróloga en una célula de ratón,

(c) usar dicha célula, o la progenie de dicha célula, para crear varios supuestos embriones de ratón o ratones transgénicos, y

(d) seleccionar un ratón o embrión de ratón que tiene dicha secuencia de nucleótidos heteróloga integrada dentro de su genoma.

35 La presente invención se refiere adicionalmente al uso del ratón transgénico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, como modelo para el estudio de una enfermedad con el objetivo de mejorar el tratamiento, mitigar o mejorar un estado patogénico, para el desarrollo o las pruebas de un cosmético o una formulación farmacéutica o para el desarrollo de un método de diagnóstico en relación con una enfermedad cutánea, cáncer de ovario o cáncer de piel.

40 La presente invención se refiere adicionalmente a un método para identificar un compuesto o composición eficaz para la prevención en el tratamiento de un fenotipo no deseado o anómalo seleccionado de un fenotipo de piel anómalo y cáncer de piel o de ovario, comprendiendo el método

(a) administrar un compuesto o composición a un ratón transgénico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5,

45 (b) evaluar el fenotipo de un ratón tratado según la etapa (a),

(c) comparar el fenotipo de un ratón tratado con un ratón de control no tratado, e

(d) identificar el compuesto o composición como eficaz para la prevención o tratamiento del fenotipo no deseado o anómalo.

Descripción detallada de la invención

En el presente documento se describe un ratón transgénico que tiene integrada dentro de su genoma una secuencia de nucleótidos heteróloga que comprende al menos una parte significativa de una secuencia de nucleótidos que codifica para una enzima quimotriptica del estrato córneo (SCCE) o una variante de la misma operativamente unida a un promotor que impulsa la expresión de *scce* heterólogo o una variante del mismo en la piel.

5 Mediante el término “heterólogo” se hace referencia a una secuencia de ADN insertada dentro de o conectada a otra secuencia de ADN que codifica para polipéptidos no codificados en la naturaleza por la secuencia de ADN a la cual está unida. Variaciones alélicas o acontecimientos mutacionales que se producen de manera natural no dan lugar a una secuencia de ADN heteróloga tal como se define en el presente documento.

10 También se describe un ratón transgénico que tiene integrada dentro de su genoma una secuencia de nucleótidos heteróloga que comprende al menos una parte significativa de una secuencia de nucleótidos que codifica para una enzima quimotriptica del estrato córneo (SCCE) o una variante de la misma operativamente unida a un promotor que impulsa la expresión de *scce* en la epidermis.

15 Mediante el término “una enzima quimotriptica del estrato córneo (SCCE) humana” se entiende una serina proteasa que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2 descrita en el documento WO95/00651 y mostrada en la lista de secuencias adjunta. La SCCE es sinónimo de calicreína 7 humana (KLK7). Sin embargo, la numeración de calicreínas no es consistente entre especies. Tal como se comenta en el ejemplo 6 la KLK7 de rata en (Kroon *et al.* 1977) no parece ser la SCCE de rata. Mediante el término “una variante de la SCCE” se entiende una variante de dicha secuencia que no tiene exactamente la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2, puede ser por ejemplo una proteasa SCCE de otra especie, tal como de una vaca, cerdo, rata o ratón, o un polipéptido sintético que comprende una parte de la SEQ ID NO: 2. La variante de la SCCE reaccionará generalmente con anticuerpos producidos frente a la SCCE humana recombinante o nativa purificada y generalmente tendrá “actividad de la SCCE” significativa, es decir ser una serina proteinasa que puede inhibirse mediante los mismos inhibidores que la disociación celular espontánea que puede inducirse en sistemas de modelo con muestras de capa cornificada de piel incubada a pH neutro o casi neutro a temperatura fisiológica, es decir aproximadamente 37°C, tal como se describe en el documento WO95/00651.

Tal como puede observarse en las siguientes tablas, existen similitudes significativas entre SCCE de diferentes especies:

Tabla 2. Alineación de secuencias de aminoácidos parciales deducidas de diferentes especies, que corresponden a residuos 162-184 de SCCE humana (Hansson *et al.* 1994). Se muestran en negrita los residuos Asn-170 y Ser-176.

SCCE de vaca	NH2...AGIPNSRT <b>N</b> ACNGD <b>S</b> GGPLMCKG..	(SEQ ID NO:4)
SCCE de cerdo	NH2...AGIPNSKT <b>N</b> ACNGD <b>S</b> GGPLVCKG...	(SEQ ID NO:5)
SCCE hum.	NH2...AGIPDSK <b>K</b> NACNGD <b>S</b> GGPLVCRG..	(SEQ ID NO:6)
SCCE de rata	NH2...AGIPDSKT <b>N</b> TCNGD <b>S</b> GGPLVCND...	(SEQ ID NO:7)
SCCE de ratón	NH2 AGIPDSKT <b>N</b> TCNGD <b>S</b> GGPLVCND...	(SEQ ID NO:8)

30 El fondo de la bolsa de especificidad de sustrato primario (véase Hansson *et al.*, 1994) en SCCE de diferentes especies (residuo n.º 170 en la tabla 2 anterior) contiene un residuo de asparagina conservado, que es único entre serina proteasas conocidas. Además, la secuencia entre este residuo y el residuo de serina activo (n.º 176 en la tabla 2) está altamente conservada. Esto sugiere que la función, por ejemplo propiedades catalíticas especializadas, de la SCCE depende fundamentalmente del residuo de asparagina mencionado.

Tabla 3. Alineación de secuencias de aminoácidos parciales deducidas de diferentes especies, que corresponden a residuos (-)7 - 27 de SCCE humana (Hansson *et al.* 1994). Se muestran en negrita los residuos adyacentes al sitio de activación (C-terminal de Lys(-1) de Arg (-1).)

SCCE de vaca	QEDQGNK <b>SGEKI</b> IDGVPCPRGSQPWQVALLKGSQQLHCG..	(SEQ ID NO: 9)
SCCE de cerdo	QEGQDK <b>SGEKI</b> IDGVPCPGSRPWQVALLKGNQLHCG...	(SEQ ID NO: 10)
SCCE hum.	...EEA <b>QGDKI</b> IDGAPCARGSHPWQVALLSGNQLHCG...	(SEQ ID NO:11)
SCCE de rata	... <b>QGERI</b> IDGYKCKEGSHPWQVALLKGDQLHCG...	(SEQ ID NO:12)
SCCE de ratón	... <b>QGERI</b> IDGIKCKEGSHPWQVALLKGNQLHCG...	(SEQ ID NO: 13)

La SCCE humana activa se forma mediante escisión C-terminal de K en la secuencia KIIDG etc. Esta activación puede catalizarse mediante tripsina *in vitro* (Hansson *et al.*, 1994).

5 Examinando la secuencia de aminoácidos adyacente a este sitio de escisión se revela un alto grado de conservación entre especies. La secuencia consenso es G-X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-I-I-D-G (SEQ ID NO:14), en la que X<sub>1</sub> es o bien aspartato (D) o bien glutamato (E), y X<sub>2</sub> es o bien lisina (K) o bien arginina (R). Aspartato y glutamato son funcionalmente similares, teniendo ambos grupos funcionales cargados negativamente. Lo mismo es válido para lisina y arginina, que tienen ambos grupos funcionales cargados positivamente y forman sitios para la escisión catalizada por enzimas con especificidad de sustrato primario similar a tripsina. La secuencia consenso adyacente al sitio de activación es única  
10 entre serina proteasas conocidas, sugiriendo una función importante. También sugiere que pueden existir enzimas en el tejido (por ejemplo) epidermis, cuya función específica es la activación de la SCCE.

También se describe un ratón transgénico que tiene integrado dentro de su genoma una secuencia de nucleótidos heteróloga que comprende al menos una parte significativa de una secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína con una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 75% con respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:2 y que contiene la secuencia parcial glicina-X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-isoleucina-isoleucina-aspartato-glicina (SEQ ID NO:14), en la que X<sub>1</sub> es aspartato o glutamato y X<sub>2</sub> es lisina o arginina, operativamente unida a un promotor que impulsa la expresión en la piel.  
15

También se describe un ratón transgénico que tiene integrada dentro de su genoma una secuencia de nucleótidos heteróloga que comprende al menos una parte significativa de una secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína con una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 75% con respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2 y que contiene la secuencia parcial (SEQ ID NO:15) X<sub>3</sub>-asparagina-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub>-X<sub>8</sub>-serina, en la que X<sub>3</sub> es cualquier residuo de aminoácido, X<sub>4</sub> es cualquier residuo de aminoácido, X<sub>5</sub> es un residuo de cisteína, X<sub>6</sub> es cualquier aminoácido, X<sub>7</sub> es un residuo de glicina, X<sub>8</sub> es un residuo de aspartato, y la serina es el residuo de serina activo característico de serina proteasas, operativamente unida a un promotor que impulsa la expresión en la piel.  
20  
25

En algunas partes de la descripción, el polipéptido codificado tiene una identidad de secuencia de al menos el 80% con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:2, tal como al menos el 90%, por ejemplo al menos el 95%, preferiblemente al menos el 98%, por ejemplo al menos el 99%.

30 Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o de dos ácidos nucleicos, las secuencias se alinean con fines de comparación óptima (por ejemplo, pueden introducirse huecos en la secuencia de una primera secuencia de aminoácidos o ácido nucleico para la alineación óptima con una segunda secuencia de aminoácidos o ácido nucleico). Entonces se comparan los residuos de aminoácido o nucleótidos en las correspondientes posiciones de aminoácido o posiciones de nucleótido. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido que en la correspondiente posición en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de identidad= n.º de posiciones idénticas/ n.º total de posiciones (por ejemplo, posiciones solapantes) x 100). Las dos secuencias pueden tener la misma longitud.  
35

La alineación de dos secuencias para la determinación del porcentaje de identidad puede realizarse usando un algoritmo matemático. Un ejemplo preferido, no limitativo de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, modificadas como en Karlin y Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877. Un algoritmo de este tipo se incorpora en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul, *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410. Pueden realizarse búsquedas de nucleótidos de BLAST con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12, para obtener secuencias de nucleótidos homologas a moléculas de ácido nucleico de la invención. Pueden realizarse búsquedas  
40  
45

de proteínas de BLAST con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a una molécula de proteína descrita en el presente documento. Para obtener alineaciones con hueco para fines de comparación, puede utilizarse Gapped BLAST tal como se describe en Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-402. Alternativamente, puede utilizarse PSI-Blast para realizar una búsqueda iterada que detecta relaciones distantes entre moléculas. Cuando se utilizan los programas NBLAST, XBLAST, y Gapped BLAST, pueden usarse los parámetros por defecto de los respectivos programas. Véase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Alternativamente, puede calcularse la identidad de secuencia después de haber alineado las secuencias por ejemplo mediante el programa de Pearson W.R y D.J. Upman (*Proc Natl Acad Sci USA* 85: 2444-2448, 1998) en la base de datos EMBL ([www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST)). Generalmente, pueden usarse los parámetros por defecto con respecto a por ejemplo "matriz de puntuación" y "penalización por hueco" para la alineación.

Puede determinarse el porcentaje de identidad entre dos secuencias usando técnicas similares a las descritas anteriormente, con o sin permitir huecos. En el cálculo del porcentaje de identidad, sólo se cuentan coincidencias exactas.

Mediante la expresión "al menos una parte significativa de una secuencia de nucleótidos que codifica para la SCCE" se entiende una secuencia de nucleótidos (es decir una secuencia de ADN o una secuencia de ARN) que codifica para un polipéptido que tiene al menos una parte de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:2 y preferiblemente que da como resultado un fenotipo anómalo tal como se describe a continuación. Se contempla que es útil e incluso puede que necesario incluir secuencias de intrón cuando se prepara una secuencia de nucleótidos que codifica para una SCCE o una variante de la misma, es decir uno o más de los intrones presentes en el *scce* humano mostrado en la tabla 1 (véanse también anotaciones del número de registro de GenBank AF332583) o uno o más de los intrones murinos que pueden deducirse de la secuencia murina. Es probable que no sean necesarias todas las secuencias de intrón y que secuencias de intrón de SCCE de otras especies o secuencia de intrón de genes que codifican para otras proteínas también pueden ser adecuadas y deberían insertarse en la secuencia de nucleótidos que codifica para la SCCE en una manera adecuada.

Se contempla que sólo una parte minoritaria de la SCCE es necesaria con el fin de obtener el fenotipo anómalo. Mediante la expresión "una parte significativa" se entiende una secuencia de nucleótidos que codifica para al menos 50 aminoácidos de SEQ ID NO:2, por ejemplo al menos 70 aminoácidos, al menos 100 aminoácidos, al menos 150 aminoácidos o al menos 200 aminoácidos. Se considera que estas longitudes son "una parte significativa del péptido mostrado en SEQ ID NO:2". Los polipéptidos codificados pueden ser más largos que las longitudes establecidas anteriormente, que entonces indicarán las partes que son comunes entre los polipéptidos codificados y SEQ ID NO:2. Generalmente, sin embargo, tal secuencia de nucleótidos comprenderá la parte principal de la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO:1 descrita en el documento WO95/00651 y mostrada en la lista de secuencias adjunta, tal como al menos 500 nucleótidos, por ejemplo al menos 600 nucleótidos, al menos 650 nucleótidos, al menos 700 nucleótidos, por ejemplo 750 nucleótidos.

Tales secuencias de nucleótidos se hibridarán generalmente con la secuencia complementaria a la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 1 o una parte de la misma en condiciones de hibridación rigurosas. También, se describe un ratón transgénico que tiene integrada dentro de su genoma una secuencia de nucleótidos que se hibrida con la secuencia complementaria con respecto a la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 1 o una parte de la misma en condiciones de hibridación rigurosas, preferiblemente en condiciones altamente rigurosas, comprendiendo dicha secuencia al menos una parte significativa de una secuencia de nucleótidos que codifica para una enzima quimotriptica del estrato córneo (SCCE) o una variante de la misma operativamente unida a un promotor que impulsa la expresión de *scce* en la piel. En una descripción particularmente interesante de dicho ratón transgénico dicho promotor impulsa la expresión de *scce* en la epidermis. El término "riguroso" cuando se usa junto con condiciones de hibridación es tal como se define en la técnica, es decir 15-20°C bajo el punto de fusión  $T_m$ , véase Sambrook *et al*, 1989, páginas 11.45-11.49. Preferiblemente, las condiciones son "altamente rigurosas", es decir 5-10°C bajo el punto de fusión  $T_m$ . Sin embargo, debido a la degeneración del código genético las secuencias de nucleótidos, que sólo tienen una semejanza minoritaria con SEQ ID NO:1, también puede que puedan codificar para una SCCE.

Los vectores para la expresión de los ácidos nucleicos que tienen secuencias de nucleótidos que codifican para una SCCE requieren que el ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica para una SCCE humana esté "operativamente unido". Un ácido nucleico está operativamente unido cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor o potenciador está operativamente unido a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de las secuencias. El promotor y potenciador pueden ser la misma o dos diferentes entidades. El promotor temprano de SV40 es un ejemplo de un promotor y potenciador integrado. Operativamente unido significa que las secuencias de ADN que están unidas son contiguas y, cuando es necesario unir dos regiones que codifican para proteína, contiguas y en un marco de lectura. Mediante el término "un constructo de SCCE" se entiende una secuencia de nucleótidos que comprende al menos una parte significativa de una secuencia de nucleótidos que codifica para una enzima quimotriptica del estrato córneo (SCCE) o una variante de la misma operativamente unida a un promotor que impulsa la expresión de *scce* en la piel o parte de la piel. En

particular se contempla un constructo de SCCE que comprende un promotor que impulsa la expresión de scce en la epidermis.

Según la presente descripción el promotor es un promotor ubicuo. Mediante el término “promotor ubicuo” se entiende un promotor que es activo en muchos tipos de célula diferentes del organismo huésped en contraste con un promotor cuya expresión es específica para uno o algunos tipos de célula diana (un promotor específico de tejido). Un ejemplo de “promotor ubicuo” es el promotor de SV40 y variaciones del mismo tales como el promotor temprano de SV40. Otros ejemplos de promotores ubicuos son otros promotores virales tales como promotor temprano de polioma, promotores de adenovirus de repeticiones de terminaciones largas retrovirales (5'-LTR), y genes celulares de mantenimiento tales como  $\beta$ -actina y promotores de proteína ribosómica. El promotor es preferiblemente un promotor heterólogo.

También se describe un ratón transgénico que comprende una secuencia de nucleótidos heteróloga que comprende una parte significativa de secuencia de ADN que codifica para la SCCE humana tal como se muestra en SEQ ID NO:1. También se describe un ratón transgénico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para una parte significativa del péptido mostrado en SEQ ID NO: 2 tal como se definió anteriormente. En realizaciones preferidas, la secuencia de ADN codifica para el péptido que corresponde al aminoácido n.º -7 a n.º 224 de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2, el péptido que corresponde al aminoácido n.º 1 a n.º 224 de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2 o el péptido mostrado en SEQ ID NO: 2. Realizaciones actualmente preferidas se refieren a ratones transgénicos según la invención, en los que la secuencia de ADN comprende el ADN mostrado en SEQ ID NO: 1 o la secuencia de ADN es SEQ ID NO: 1.

En una realización importante de la invención, el ratón transgénico según la invención muestra un fenotipo anómalo, tal como un fenotipo de piel anómalo y/o una predisposición para cáncer de ovario o cáncer de piel. Preferiblemente, el ratón según la invención muestra un fenotipo de piel anómalo que se asemeja a una o más enfermedades cutáneas inflamatorias caracterizadas por hiperqueratosis epidérmica, acantosis, inflamación epidérmica y/o dérmica y/o prurito, por ejemplo enfermedades cutáneas heredadas con hiperqueratosis epidérmica, ictiosis vulgar, psoriasis, dermatitis atópica crónica o eccema crónico. El ratón según la invención puede mostrar por tanto hiperqueratosis epidérmica, acantosis, inflamación epidérmica/dérmica y/o prurito.

Por tanto la presente invención se refiere a un ratón transgénico que tiene integrada dentro de su genoma una secuencia de nucleótidos heteróloga que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína con una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 75% con respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2, en el que dicha proteína presenta actividad de la enzima quimotriptica del estrato córneo (SCCE), y en el que dicha secuencia de nucleótidos heteróloga está operativamente unida al promotor temprano de SV40.

La presente invención se refiere a un método para preparar un ratón transgénico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende las etapas de:

- (a) construir y amplificar una secuencia de nucleótidos heteróloga que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína con una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 75% con respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2, en el que dicha proteína presenta actividad de la enzima quimotriptica del estrato córneo (SCCE), y en el que dicha secuencia de nucleótidos heteróloga está operativamente unida al promotor temprano de SV40,
- (b) introducir dicha secuencia de nucleótidos heteróloga en una célula de ratón,
- (c) usar dicha célula, o la progenie de dicha célula, para crear un número de supuestos embriones de ratón o ratones transgénicos, y
- (d) seleccionar un ratón o embrión de ratón que tiene dicha secuencia de nucleótidos heteróloga integrada dentro de su genoma.

En una realización preferida, la invención se refiere a un método para preparar un ratón transgénico según la invención, en el que el ratón muestra un fenotipo anómalo tal como se definió anteriormente. Comprendiendo el método introducir el constructo de SCCE en un óvulo o embrión del ratón por medios físicos, químicos o virales, por ejemplo mediante electroporación, transfección, microinyección o infección viral. En una realización preferida de la invención, el constructo de SCCE se microinyecta en un óvulo o embrión del ratón o en células madre embrionarias del ratón. En una realización preferida, el método según la invención comprende microinyectar el constructo de SCCE en óvulos o embriones de ratones C57BL/6JxCBA-f2. El método preferiblemente comprende además cruzar los ratones resultantes con C57BL/6JxCBA o con C57BL/6J para obtener camadas transgénicas y líneas de ratón estables. Se contempla que tales líneas celulares estables derivadas de los ratones transgénicos que comprenden un constructo de SCCE tal como se describió anteriormente son útiles por ejemplo para la selección de alto

rendimiento de compuestos adecuados tal como se describe a continuación.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del ratón transgénico según la invención como un modelo para el estudio de la enfermedad con el objetivo de mejorar el tratamiento, mitigar o mejorar un estado patogénico, para el desarrollo o las pruebas de un cosmético o una formulación farmacéutica o para el desarrollo de un método de diagnóstico. Un uso preferido según la invención de dicho ratón transgénico es como un modelo para una enfermedad cutánea o un modelo para cáncer de piel o de ovario.

La presente invención se refiere además al uso del ratón transgénico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, como modelo para el estudio de una enfermedad con el objetivo de mejorar el tratamiento, mitigar o mejorar un estado patogénico, para el desarrollo o las pruebas de un cosmético o una formulación farmacéutica o para el desarrollo de un método de diagnóstico en relación con enfermedad cutánea, cáncer de ovario o cáncer de piel.

La presente invención se refiere además a un método para identificar un compuesto o composición eficaz para la prevención o tratamiento de un fenotipo no deseado o anómalo seleccionado de un fenotipo de piel anómalo y cáncer de piel o de ovario, comprendiendo el método

- (a) administrar un compuesto o composición a un ratón transgénico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5,
- (b) evaluar el fenotipo de un ratón tratado según la etapa (a),
- (c) comparar el fenotipo de un ratón tratado con un ratón de control no tratado, e
- (d) identificar el compuesto o composición como eficaz para la prevención o tratamiento del fenotipo no deseado o anómalo.

Una realización actualmente preferida de la invención se refiere a un método para seleccionar o identificar un compuesto o composición eficaz para la prevención o tratamiento de enfermedades cutáneas inflamatorias con picor tales como ictiosis vulgar, prurigo nodular, neurodermatitis, liquen plano. Otras realizaciones preferidas de la invención se refieren a un método para seleccionar o identificar un compuesto o composición eficaz para la prevención o tratamiento de dermatitis atópica crónica y psoriasis. Además, la invención se refiere a un método según la invención para seleccionar una composición cosmética.

**Leyenda de las figuras**

Figura 1. Organización de los genes estructurales humano y murino y el gen *sv40e/hscce* recombinante. Los seis exones se indican como recuadros negros. Los sitios de iniciación de traducción, ubicado en el exón 2, se indican con "ATG", y los codones de terminación en el exón 6 con "TAA". Además, la posición del elemento regulador transcripcional *sv40e* en el constructo usado para generar el animal transgénico se indica por una flecha.

Figura 2 pS99.

Figura 3.

A: Análisis de PCR cuantitativa en tiempo real del ARNm de *scce* humano recombinante en diversas preparaciones de tejido de las líneas transgénicas n.º 1010 (barras negras) y n.º 107 (barras blancas). Se llevaron a cabo análisis por triplicado en muestras de ARN que comprendían material combinado de tres animales de cada línea. Se usó la fosfoproteína P0 ribosómica ácida murina como patrón interno. Media y DE.

B. Análisis de ELISA de proteína SCCE en diversos tejidos de las líneas transgénicas n.º 1010 (barras negras) y n.º 107 (barras blancas), y hermanos no transgénicos (barras grises). Se llevaron a cabo análisis por triplicado en extractos combinados de tres animales de cada línea y controles. Media y DE.

Figura 4 Pro-SCCE y SCCE activa en la piel de ratones *scce* transgénicos n.º 1010. Hu = extracto de estrato córneo plantar humano; Tg = extracto de piel de transgén n.º 1010; Wf = extracto de piel de miembro de la camada del tipo natural. Se homogenizaron aproximadamente 0,1 g de piel de ratón en 10 ml de ácido acético 1 M y se extrajo durante la noche a 4°C. Tras el aclaramiento por centrifugación se tomaron alícuotas de los extractos, se liofilizaron y se resolubilizaron en tampón de muestra de electroforesis.

A: Inmunotransferencia con anticuerpos específicos para SCCE, muestras reducidas. Las puntas de flecha indican, desde la parte superior a la inferior, pro-SCCE glicosilada, mezcla de pro-SCCE no glicosilada y SCCE glicosilada, y SCCE no glicosilada. Cantidad de muestra aplicada correspondiente a 0,1 mg y 4,5 mg de piel para

Tg y Wt, respectivamente.

B: Zimografía en gel de acrilamida al 12,5% con caseína al 1%; muestras no reducidas. Cantidad de muestra aplicada correspondiente a 0,4 mg y 4,5 mg de piel para Tg y Wt, respectivamente. La flecha indica SCCE.

5 En el extremo izquierdo (marcado con asteriscos) marcadores de peso molecular; desde la parte superior 106, 81, 47,5, 35,3, 28,2, y 20,8 kDa respectivamente.

10 Figura 5. Comportamiento de rascado de ratones transgénicos *scce* (n.º 1010). Se observaron veintiún ratones, (11 transgénicos, 5 hembras; 10 miembros de la camada de tipo natural, 2 hembras) cada cinco días durante 45 días, empezando cuando los ratones tenían 5-6 semanas de edad. En cada punto de observación se transfirieron ratones puntuales a jaulas individuales, y se contaron los episodios de rascado con las patas traseras o delanteras durante tres periodos de 5 min. con un lapso de 2,5 min. desde la transferencia a la jaula hasta el primer recuento, y entre periodos de recuento. Se combinaron los resultados para los tres periodos de observación y se calculó el número de episodios de rascado por min. Se muestra en A el número de episodios de rascado (media y EEM para todos los animales en cada grupo), se facilita en B el porcentaje de animales con al menos un episodio de rascado por min. ■ (cuadrado) = ratones transgénicos n.º 1010; ▲ (triángulo) = miembros de la camada de tipo natural.

15 Figura 6. Histología e inmunohistología de SCCE de piel de ratón transgénico *scce* n.º 1010 y control; comparación con piel humana normal y lesión crónica de dermatitis atópica. Muestras fijadas en formaldehído e incrustadas en parafina. A-B teñidas con hematoxilina y eosina. C-F tinción con inmunoperoxidasa con anticuerpos específicos para SCCE, contratinción con hematoxilina. A y C: ratones transgénicos n.º 1010, 5 semanas de edad. B y D: miembro de la camada no transgénico. E: Dermatitis atópica. F: Piel humana normal. Barra = 50 µm.

20 Figura 7. El efecto sobre el picor en ratones transgénicos *scce* del glucocorticoide acetónico de triamcinolona. Cuadrados = acetónico de triamcinolona, n = 4; triángulos = controles (solución salina), n = 6. \* = diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre controles y grupo tratado.

25 Figura 8. El efecto sobre el picor en ratones transgénicos *scce* del antihistamínico loratadina. Barras negras = loratadina (n = 7); barras blancas = controles (n = 7); media y EE. No hubo diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de rascado entre el grupo de tratamiento y el grupo control.

## Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan para la ilustración y no pretenden limitar la invención a los ejemplos específicos proporcionados.

### EJEMPLO 1

30 *Aislamiento y clonación del gen de SCCE humana.*

Se aisló el gen de SCCE humana de una biblioteca genómica de leucocitos humanos, n.º de cat. HL 1111 j n.º de lote 3511 (Clontech, CA) usando sondas de ADNc derivadas del ADNc de *scce* humano. Se amplificó a partir de pS500 un fragmento de ADNc de 253 pb (Hansson *et al.*, 1994) mediante PCR usando SYM3300 (5'-GGTGGCCCTGCTCAGTGGCA-3') (SEQ ID NO: 16) y SYM3301 (5'-CACCATGGATGACACAGCCTGG-3') (SEQ ID NO: 17), marcado con <sup>32</sup>P mediante cebado al azar usando un kit de oligomarcage (Amersham, R.U.) y se usó como sonda para seleccionar. El fragmento cubre las bases de 149 a 401 de la secuencia de ADNc de la SCCE humana publicada (Hansson *et al.*, 1994). Se sometieron a selección aproximadamente 5x10<sup>5</sup> placas. Se prepararon filtros, se prehibridaron y se hibridaron a 65°C, y se lavaron a 65°C y 25°C según las recomendaciones de los fabricantes de membrana (membranas de transferencia de hibridación Colony/Plaque Screen™, DuPont NEN, MA). Se expusieron los filtros a Hyperfilm-MP (Amersham, R.U.). Tras tres rondas de selección, se seleccionaron clones positivos individuales, y se aisló ADN de fago usando técnicas convencionales (Sambrook *et al.*, 1989). Se digirió el ADN de fago con varias enzimas de restricción y se realizó transferencia de tipo Southern usando tres sondas diferentes. En primer lugar, se usó el fragmento 5' de 253 pb descrito anteriormente. En segundo lugar, se usó un fragmento 3' de ADNc no codificante de 618 pb como sonda. Se amplificó el fragmento mediante PCR usando pS501 como molde, cebador directo SYM3302 (5'-AATAAAGAAACACAAAACCC-3') (SEQ ID NO: 18) y cebador inverso SYM3418 (5'-TGTAATATCATTGTGGGC-3') (SEQ ID NO: 19). pS501 es un plásmido que contiene ADNc de la SCCE humana de 1888 pb aislado de una biblioteca de ADNc de queratinocito λgt11 ligado en el sitio EcoRI de pUC19 y cubre ADNc con secuencia codificante desde el aminoácido cuatro hasta el codón de terminación y contiene una secuencia 3' sin traducir adicional de 868 pb. Finalmente, se aisló un fragmento de 897 pb que contenía la secuencia de ADNc de la SCCE codificante entera a partir de pS500 digerido con EcoRI/DraI (Hansson *et al.*, 1994) y se usó como sonda. Se marcaron las sondas y se realizó la hibridación tal como se describió anteriormente. Se digirieron dos clones positivos con Sall y se clonaron en pUC19 generando pS772 y pS773. Con el fin de determinar la secuencia de ADN del gen de la SCCE humana, se generaron varios subclones solapantes de



pS772 y pS773 en pUC19. Se secuenciaron los subclones usando el método de terminación de cadena de didesoxilo (kit de secuenciación de T7, Pharmacia, Suiza o el kit de reacción lista de secuenciación de ciclo con terminador colorante, PE Applied Biosystems, CA) con cebadores M13 directo e inverso así como cebadores específicos.

#### 5 Aislamiento y clonación del gen de la SCCE de ratón.

Para aislar el gen de la SCCE murina, se aisló un fragmento de ADNc de 430 pb a partir de pS506 digerido con HindIII/SallI (Bäckman *et al.*, 1999). Se marcó el fragmento con <sup>32</sup>P mediante cebado al azar usando un kit de oligo-marcaje (Amersham, R.U.), y se usó como sonda para someter a selección una biblioteca genómica de 129SVJ-Lambda Fix II (Stratagen, CA). Se sometieron a selección aproximadamente 1x10<sup>6</sup> placas. Se prepararon las transferencias, se prehibridaron y se hibridaron a 65°C tal como se describe por el fabricante (membranas de transferencia de hibridación Colony/ Plaque Screen™, DuPont NEN, MA). También se realizó un lavado tal como se describe en el protocolo de hibridación y se expusieron las membranas a Hyperfilm-MP (Amersham, R.U.). Se seleccionaron clones positivos individuales tras tres rondas de selección. Se investigaron adicionalmente algunas placas positivas mediante PCR usando SYM4118 (5'-GGATGTGAAGTCATCTC-3') (SEQ ID NO: 20) y SYM4121 (5'-TGGAGTCGGGGATGCCAG-3') (SEQ ID NO: 21). Se analizaron los productos de PCR obtenidos mediante transferencia de tipo Southern usando la sonda y condiciones descritas anteriormente. Se aisló ADN de fago a partir de clones positivos confirmados usando técnicas convencionales. Se realizó el análisis de tipo Southern en el ADN de fago digerido con un panel de enzimas de restricción usando la sonda y condiciones descritas anteriormente. Se digirió uno de los clones positivos con SacI, y se aisló un fragmento de ~15,5 kb y se clonó en pUC19 generando pS714. Se generaron varios subclones solapantes de pS714 en pUC19. Se realizó la secuenciación de ADN de los subclones tal como se describe para el gen de la SCCE humana.

#### Análisis de extensión de cebador.

Se usaron dos oligonucleótidos específicos del exón 1; uno humano y uno de ratón, para determinar los extremos 5' de los transcritos de la SCCE humana y murina. Para determinar el inicio del transcrito humano (Ausubel *et al.*) se amplificó un fragmento de PCR de 346 pb a partir del plásmido pS779 (un subclón que cubre la secuencia 5' no traducida, los exones 1-3, el extremo 5' del exón 4 y los intrones 1-3) usando el cebador directo SYM4720 (5'-GGGAGGGTGGAGAGAGA GTGCAGTG) (SEQ ID NO: 22) y el cebador inverso SYM4899(5'-AGTCTAGGCTGCAG CCCCTAC-3') (SEQ ID NO: 23). Para preparar una sonda monocatenaria marcada con <sup>32</sup>P-dCTP de 245 pb, se hibridó el cebador hEXON1 (5'-CTCGAGGGATCTGATGTGATCC-3') (SEQ ID NO: 24) al fragmento amplificado y se realizó el marcaje usando el kit de marcaje de ADN Prime-A-Probe™ (Ambion, Austin, Texas, EE. UU.). Se mezclaron 10<sup>6</sup> cpm de sonda marcada con 50 µg de ARN total de piel humana. Se realizaron la hibridación y el tratamiento S1 usando S1-Assay™ (Ambion, Austin, Texas, EE. UU.). Se analizó el producto final en un gel de secuenciación. Se usaron reacciones de secuenciación didesoxilo del pS779 cebado con oligo hEXON1 como marcadores de tamaño.

Se determinó el inicio del transcrito murino usando pS721 linealizado con SacI (un subclón que cubre la secuencia 5' no traducida, los exones 1-3, los intrones 1-2 y el extremo 5' del intrón 3). Se preparó una sonda monocatenaria marcada con <sup>32</sup>P-dCTP de 225 pb hibridando el cebador mEXON1 (5'-CTGGGAGTGACTTGCGCTGGCTCT-3') (SEQ ID NO: 25) al plásmido lineal y se realizó el marcaje usando el kit de marcaje de ADN Prime-A-Probe™ (Ambion, Austin, Texas, EE. UU.). Se mezclaron 10<sup>6</sup> cpm de sonda marcada con 50 µg de ARN total aislado de cola de ratón. Se realizaron la hibridación y el tratamiento S1 usando S1-Assay™ (Ambion, Austin, Texas, EE. UU.). Se analizó el producto obtenido tal como se describió anteriormente usando reacciones de secuenciación de pS721 cebado con oligo mEXON1 como marcadores de tamaño.

#### RESULTADOS

(Secuencia de nucleótidos en Gene Bank: scce humano (hSCCE): número de registro AF332583; scce murino (mSCCE): número de registro AF339930).

Se sometió a selección una biblioteca genómica de leucocito humano EMBL3λ usando una sonda preparada a partir de la región codificante de ADNc de scce humano (Hansson *et al.*, 1994) se identificaron clones positivos individuales. Basándose en el análisis de restricción y transferencia de tipo Southern se seleccionaron dos clones solapantes, de 12 y 15,5 kpb de tamaño respectivamente. Estos clones abarcaban el ADNc de scce entero. La estructura genómica del gen estructural scce humano comprende seis exones y abarca aproximadamente 8 kb. La organización y tamaños de exones e intrones se muestran en la figura 1. El sitio de iniciación de traducción (denominado +1) se encuentra a 60 nucleótidos en sentido 3' del extremo 5' del exón 2.

Para aislar el gen scce murino, se sometió a selección una biblioteca genómica de SVJ129-λFIX™ II usando una sonda correspondiente a la región codificante del ADNc de scce murino (Bäckman *et al.*). Entre los clones aislados se demostró que uno que albergaba aproximadamente 15,5 kb contenía el gen estructural murino entero. Se

secuenció una parte principal que comprendía 11.770 nucleótidos y se mostró que el gen *scce* estructural murino era más corto que el gen humano. Sin embargo, la organización global revela varias similitudes con el homólogo humano y también consiste en seis exones (figura 1). Puesto que el sitio de poliadenilación del ADNc murino aún no se ha identificado, no pudo determinarse el tamaño exacto del exón 6. Sin embargo, se ubicó un supuesto sitio poli A a 136 pb en sentido 3' del codón de terminación. El sitio de iniciación de traducción (denominado +1) se encuentra en el exón 2, 39 nucleótidos en el sentido 3' del intrón 1, unión 3'-intrón-exón.

Para determinar extremos 5' de los transcritos humano y murino se realizaron estudios de extensión de cebador. El análisis de secuencia del ADNc humano (exon1, resultados sin publicar) reveló que el producto de extensión de cebador humano principal se extiende al nucleótido identificado en el extremo 5' de la secuencia de ADNc humana (Hansson *et al.*). El análisis de los dos productos principales obtenidos del gen murino mediante extensión de cebador revela dos inicios de transcripción diferentes. Un producto se extiende a un nucleótido 5' del extremo 5' del ADNc de SCCE murina (Bäckman *et al.*). El otro producto se extiende a un nucleótido 3' del extremo 5' del ADNc.

## EJEMPLO 2

*Generación y caracterización fenotípica macroscópica de ratones transgénicos *scce* con el gen *hscce* bajo el control del promotor SV40e*

*Construcción del transgén.*

Con el fin de sobreexpresar el gen estructural *scce* genómico humano bajo la regulación de transcripción del promotor y potenciador temprano del virus del simio 40, SV40e, se construyó un vector de expresión. Se modificó el ADN genómico de *scce* mediante la inserción de ligadores HindIII 20 pb en el sentido 5' del codón de iniciación y 4,8 kb en el sentido 3' del codón de terminación, respectivamente. Se ligó el fragmento *scce* HindIII resultante a un fragmento de pS99 BamHI/HindIII de 325 pb (figura 2) que contenía los elementos potenciador y promotor SV40e y se clonó en pBluescript SK+/- (Stratagene) dando como resultado pAM119. Para la transferencia génica, se digirió el plásmido pAM119 con BamHI y ClaI y se aisló el fragmento SV40e/*scce* de aproximadamente 10,7 kb y se purificó mediante electroelución antes de su microinyección dentro de oovalbúmina de ratón de estadio unicelular.

Se generaron ratones transgénicos en embriones C57BL/63xCBA-f2 mediante procedimientos de microinyección convencionales (Hogan *et al.*, 1986). Se escindió el fragmento de SV40e/*scce* de 10,7 kb que iba a inyectarse del plásmido pAM119 mediante escisión con enzima de restricción con BamHI y ClaI, se separó mediante electroforesis en gel a través de gel de agarosa, se retiró, se aisló usando isotacofresis y se precipitó con etanol.

*Identificación de animales transgénicos.*

Para identificar animales transgénicos, se extrajo ADN a partir de biopsias de cola de ratones de 3 semanas de edad y se analizó el ADN o bien mediante análisis de transferencia de tipo Southern o bien con PCR tal como se describe en Ausubel *et al.* Se realizó el análisis de PCR usando cebadores específicos para *scce* humano (IE2: 5'-GCT CTC CCA TTA GTC CCC AGA GA-3' (SEQ ID NO: 26), MJ2: 5'-CCA CTT GGT GAA CTT GCA CAC TTG-3' (SEQ ID NO: 27)). En resumen, se realizó la PCR con una desnaturalización inicial a 95°C durante 10 min., seguido por 28 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 s, hibridación a 65°C durante 30 s, elongación a 72°C durante 45 s y finalmente por una elongación de 10 min. a 72°C. Se analizaron los productos de PCR resultantes mediante electroforesis en gel de agarosa convencional usando un gel de agarosa al 1% y visualizando el ADN con bromuro de etidio tal como se describe en Ausubel *et al.*, 1992. Se establecieron tres líneas transgénicas (n.º 103, n.º 107 y n.º 1010) cruzando ratones heterocigóticos con C57BL/ 6JxCBA.

## RESULTADOS

Tal como se esperaba, la caracterización inicial de las tres líneas reveló diferencias muy grandes en niveles de expresión de *scce* recombinante (véase el ejemplo 3). En la línea n.º 1010, que tiene los niveles de transcripción de *hscce* más altos, eran evidentes las anomalías cutáneas, mientras que en las otras dos líneas no podían observarse cambios en la piel u otras desviaciones fenotípicas macroscópicas. Para estudios comparativos detallados adicionales de los transgénicos n.º 1010 se incluyeron una de las líneas con fenotipo aparentemente normal (n.º 107) y miembros de la camada no transgénicos como controles. Se observaron cambios fenotípicos macroscópicos en animales n.º 1010 transgénicos como una pérdida de pelo de una zona estrecha alrededor de los ojos en ratones de 4-5 semanas de edad. En ratones mayores hubo una disminución aparente del pelo corporal en general, y una apariencia sin brillo del pelaje. En el lomo la superficie de la piel estaba cubierta a veces con escamas finas. Desde la edad de 5-6 semanas y en adelante varios de estos animales transgénicos mostraron signos de picor con rascado, cuya frecuencia aumentó con el tiempo.

Se llevaron a cabo autopsias diagnósticas con análisis histológicos de rutina en ratones transgénicos de las líneas C57BL/6JxCBA n.º 1010 y n.º 107, y controles de miembros de la camada. Los tejidos examinados fueron cerebro,

cerebelo, intestinos (duodeno/yeyuno, ileo, colon, recto) y piel. En algunos animales de 3 semanas de edad también se examinaron el corazón, hígado, pulmón, glándula salivar, bazo, timo y tiroides. No se observaron anomalías macro o microscópicas significativas en controles de miembros de la camada (para n.º 1010: 3 semanas, n = 5; 5 semanas, n = 5; para n.º 107 5 semanas, n = 3) y ratones transgénicos de la línea n.º 107 (5 semanas n = 3). Se encontraron anomalías en la piel en animales transgénicos de la línea n.º 1010, pero en ningún otro órgano o tejido. En ratones de 3 semanas de edad (es decir antes de que pudieran observarse cambios fenotípicos mediante inspección de animales vivos) se encontraron cambios en la piel en todos los animales examinados (n = 4). Estos cambios incluyen hiperplasia e hiperqueratosis epidérmica de leve a moderada y una reacción inflamatoria celular leve con leucocitos mixtos en la dermis superior. En animales de 5 semanas de edad (n = 4) las anomalías cutáneas fueron del mismo tipo pero más pronunciadas con una hiperplasia similar a la acantosis marcada y una hiperqueratosis de la epidermis que era principalmente ortoqueratótica. Además, aumentó el número de mastocitos en la dermis en algunos de los animales. Se encontró ocasionalmente invasión de leucocitos de la epidermis y entonces se manifestó como grupos pequeños de granulocitos dentro de la capa cornificada engrosada, que en estos sitios era paraqueratótico.

### 15 EJEMPLO 3

*Determinación de la expresión de ARNm de scce, proteína SCCE en ratones y SCCE catalíticamente activo en ratones transgénicos SV40e-scce.*

*Aislamiento de tejidos.*

Se recogieron muestras de tejido a diferentes edades y se congelaron inmediatamente y almacenaron en nitrógeno líquido hasta que se analizaron.

*Aislamiento de ARN y síntesis de ADNc y PCR cuantitativa en tiempo real.*

Se preparó ARN total a partir de 50-300 mg de los tejidos aislados de hígado, piel, pulmón, cerebro, intestino delgado, colon y oreja, usando RNA STAT-60™ (Tel-Test "B", Inc., Friendswood, TX, EE. UU.) según el fabricante. Se trataron con ADNasa 50µg de cada preparación de ARN usando RQ1 DNase (Promega, Madison, WI, EE. UU.) según Ausubel *et al.* Se usaron aproximadamente 1,6 µg de ARN total de cada tejido para la síntesis de ADNc. Se mezclaron tres muestras de ARN de animales con los mismos antecedentes genéticos y tejido y se realizó la síntesis de ADNc usando el sistema de preamplificación para síntesis de ADNc de primera cadena Superscript™ (Life Technologies, Inc. Gaithersburg, MD, EE. UU.) según el fabricante. Se cebó la síntesis de ADNc usando cebador Oligo d(T)<sub>12-18</sub>. Se diluyó el ADNc sintetizado 100x en agua previo a la cuantificación en tiempo real. Se realizó la cuantificación en tiempo real tres veces en cada ADNc. Se diseñaron el cebador y sonda para la cuantificación en tiempo real de SCCE humana transgénica sobre los exones cuatro y cinco en el que la secuencia entre la SCCE humana y murina muestra poca (menos) homología. El cebador directo (5'-GCGAACCCCTGGAACAA-3') (SEQ ID NO: 28) cubre la posición 427 - 444 de la secuencia de ADNc humano (ref. Hansson *et al.*) en el exón cuatro. El cebador inverso (5'-ACATCCACGCACATGAGGTCA-3') (SEQ ID NO: 29) cubre la posición 490 - 510 de la secuencia de ADNc humano en el exón cinco. La sonda de amplificación en tiempo real (5'-CCTGTACTGTCTCCGGCTGGGGCACTACC-3') (SEQ ID NO: 30) cubre la posición 445 - 473 de la secuencia de ADNc humano en el exón cuatro, y se marcó con el colorante fluorescente indicador FAM en el extremo 5' y el colorante fluorescente extintor TAMRA en el extremo 3'. Se realizó la amplificación de productos de PCR y detección en tiempo real en el sistema de detección de secuencia ABI Prism 7700 (PE Applied Biosystems, Foster City CA, EE. UU.). Se usó la amplificación de una parte de fosfoproteína P0 ribosómica ácida murina (ACC n.º X15267) como control endógeno para los estudios de cuantificación en tiempo real. Se calculó la cuantificación relativa según la fórmula  $2^{-\Delta\Delta T}$ , en la que  $\Delta C_T$  es la diferencia en valores CT entre la diana y el control endógeno (User Bulletin n.º 2, PE Applied biosystems).

*Anticuerpos policlonales específicos para SCCE.*

Se prepararon anticuerpos policlonales para SCCE humana recombinante y se purificaron mediante afinidad tal como se describe por Sondell *et al.* (Sondell *et al.* 1996). Estos anticuerpos son reactivos frente a SCCE humana y pro-SCCE, así como SCCE murina.

*Preparación del tejido, ELISA, inmunotransferencia y zimografía.*

Se prepararon extractos de tejido para ELISA mediante homogenización de 200-400 mg de tejido congelado en 1 ml de dH<sub>2</sub>O que contenía una mezcla de inhibidores de proteasa (Complete TM Protease inhibitor Cocktail Tablets n.º cat. 1836153, Boehringer Mannheim, Alemania), seguido por centrifugación a 20.000 x g durante 30 min. a 4°C. Se determinaron las concentraciones de proteína mediante la reacción con ácido bicinonínico con albúmina sérica bovina como patrón para electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, se homogeneizaron aproximadamente 0,1 mg de piel de ratón en 10 ml de ácido acético 1 M y se extrajo durante la noche a 4°C. Tras el aclaramiento por

centrifugación se tomaron alícuotas de los extractos, se liofilizaron y se resolubilizaron en tampón de muestra de electroforesis para zimografía. Se llevaron a cabo la electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, zimografía e inmunotransferencia tal como se describe (Ekholm *et al.* 2000).

5 Para ELISA, se recubrieron placas de microtitulación de poliestireno con 100  $\mu$ l de anticuerpos policlonales de conejo específicos para SCCE a una concentración de 7  $\mu$ g/ml preparados en tampón de recubrimiento ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,1 M,  $\text{NaN}_3$  al 0,02% (p/v), pH 9,6). Tras la incubación durante la noche a 4°C sobre una mesa de agitación, se lavó la placa una vez con tampón de lavado ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  10 mM, NaCl 0,15 M, Tween 20 al 0,05% (v/v), pH 7,2). Después de eso, se añadieron 200  $\mu$ l de tampón de bloqueo ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  10 mM, NaCl 0,15 M, albúmina sérica bovina (BSA) al 0,1% (p/v), pH 7,2) a cada pocillo y se incubó la placa a 37°C durante 1 h. Se lavó la placa tres veces con tampón de lavado, se añadieron 50  $\mu$ l de muestra (o patrón) en tampón de dilución ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  10 mM, NaCl 0,15 M, BSA al 0,1% (p/v), Tween 20 al 0,05% (v/v), pH 7,2) a cada pocillo y se incubó la placa durante 1 h a 37°C. Se lavaron las placas tres veces con tampón de lavado, y se prepararon adicionalmente añadiendo 100  $\mu$ l/pocillo de anticuerpos específicos para SCCE (7  $\mu$ g/ml) marcados con fosfatasa alcalina. Se incubaron las placas durante 1 h a 37°C antes de lavar tres veces con tampón de lavado. Se realizó el desarrollo añadiendo 100  $\mu$ l disolución de sustrato recién preparada (2 comprimidos de sustrato de fosfatasa (comprimidos de sustrato de fosfatasa Sigma104) disueltos en 10 ml de dietanolamina-HCl 0,1,  $\text{MgCl}_2$  0,5mM, pH 9,8). Se incubaron las placas en la oscuridad durante 30 min. a temperatura ambiente. Finalmente, se añadieron 25  $\mu$ l de disolución de parada a cada pocillo y se leyó la absorbancia a 405 nm. Se usó como patrón para la cuantificación pro-SCCE humana recombinante (Hansson *et al.*).

## RESULTADOS

20 *Cuantificación en tiempo real de la SCCE humana transcrita en ratones transgénicos.*

Con el fin de investigar si la diferencia en el fenotipo de piel entre líneas transgénicas n.º 1010 ABD n.º 107, se analizó la expresión de ARNm de *hscce* en diversos tejidos mediante RT-PCR cuantitativa. Los resultados se muestran en la figura 3A.

25 Se analizaron seis tejidos diferentes. Los análisis mostraron expresión significativamente mayor de *hscce* en todos los tejidos examinados para ratones transgénicos de la línea n.º 1010 en comparación con ratones de la línea n.º 107 y miembros de la camada no transgénicos. Se encontraron los niveles de ARNm de *hscce* relativos más altos en los intestinos y pulmones, pero la diferencia en expresión de *hscce* entre las dos líneas transgénicas fue más pronunciada para la piel, en la que el nivel relativo de ARNm de *hscce* fue aproximadamente 24 veces más alto en ratones n.º 1010 que en ratones n.º 107.

30 *ELISA*

Los análisis de la proteína SCCE con ELISA (figura 4B) mostraron valores próximos o inferiores al límite de detección para tejidos de transgénicos de la línea n.º 107 y controles normales. En transgénicos n.º 1010 la proteína SCCE era fácilmente detectable en varios tejidos incluyendo piel, intestinos y pulmón, siendo el nivel relativo (ng/mg) más alto en la piel.

35 *Inmunotransferencia y zimografía*

40 La inmunotransferencia con anticuerpos específicos para SCCE corroboró los resultados de ELISA. En extractos de piel de ratones control se detectaron cantidades pequeñas de un componente con masa molecular similar a SCCE humana, mientras que se detectó un componente con la misma masa molecular relativa en cantidades altas en extractos de piel de ratones transgénicos n.º 1010 (figura 4A). La zimografía en geles de acrilamida que contienen caseína mostró que los extractos de piel de los transgénicos n.º 1010 contenía una enzima proteolítica con la misma movilidad electroforética que la SCCE humana. No pudo detectarse una enzima correspondiente en extractos control (figura 4B; las cantidades de la SCCE murina activa son muy bajas para detectarse en las condiciones experimentales usadas). Estos resultados sugieren que una fracción de la pro-SCCE humana producida en la piel de los transgénicos n.º 1010 se convierte en una enzima proteolíticamente activa. Esto también estaba soportado por los experimentos de inmunotransferencia (figura 3A), en los que un componente correspondiente a la SCCE humana activa se marcó con los anticuerpos. Además de la SCCE, los extractos de piel de transgénicos n.º 1010 contenían cantidades aumentadas de una enzima proteolítica no relacionada con SCCE. Actualmente no se conoce la naturaleza de esta enzima.

## CONCLUSIÓN

50 La expresión de *hscce* en diversos tejidos a nivel de ARN fue superior en ratones transgénicos n.º 1010 que en los ratones transgénicos n.º A107. La diferencia entre transgénicos de las dos líneas fue incluso más pronunciada con respecto a la expresión de la proteína SCCE. En la piel de ratones transgénicos n.º 1010 pudieron detectarse con inmunotransferencia cantidades altas de la proteína SCCE. La mayoría de esta proteína parecía ser pro-SCCE, pero

también pudo detectarse SCCE activa en cantidades aumentadas.

#### EJEMPLO 4

##### *Ratones transgénicos scce como modelos para estudios de enfermedades cutáneas inflamatorias y picor*

5 Se aparearon tres ratones transgénicos n.º 1010 machos con hembras C57BL/6J del tipo natural, dando como resultado 6 camadas con un total de 40 ratones. De estos, 19 (8 transgénicos) se sacrificaron a la edad de 7-8 semanas y se realizó un seguimiento de 21 (11 transgénicos) hasta la edad de 13-14 semanas. En el último grupo se cuantificaron los movimientos de rascado con las patas.

10 Se observaron cambios fenotípicos macroscópicos en animales transgénicos n.º 1010 como una pérdida de pelo de una zona estrecha alrededor de los ojos en ratones de 4-5 semanas de edad. En ratones mayores hubo una disminución aparente del pelo corporal en general, y una apariencia sin brillo del pelaje. En el lomo la superficie cutánea estaba cubierta a veces con escamas finas. Desde la edad de 5-6 semanas y en adelante varios de estos animales transgénicos mostraron signos de picor con rascado, cuya la frecuencia aumentó con el tiempo.

##### *Comportamiento de rascado*

15 De los 11 ratones transgénicos de los que se realizó un seguimiento durante 13-14 semanas, 8 animales (73%) mostraron signos de picor (al menos un período de rascado con las patas delanteras o traseras por minuto) a la edad de 10-11 semanas. La frecuencia de rascado varió entre los animales observados; mientras que algunos animales mostraron signos de picor débiles o moderados, otros animales pasaron la mayoría de su tiempo rascándose (figura 5). Hasta la edad de 3 semanas no hubo diferencia estadísticamente significativa en peso entre animales transgénicos y normales. Al aumentar la edad hubo una tendencia hacia pesos inferiores entre transgénicos. A la edad de 14-15 semanas había una reducción en peso en transgénicos del 7-10% en comparación con miembros de la camada del tipo natural (media para machos de 27,0 gm frente a 30,0 gm;  $p = 0,022$ ; media para hembras de 21,7 gm frente a 23,5 gm;  $p = 0,033$ ).

##### *Análisis histológico*

25 Para histología e inmunohistoquímica (Ekholm *et al.* 1998 y Sondell *et al.* 1996) o bien se fijaron las muestras en formaldehído y se incrustaron en parafina según los protocolos de rutina o bien se congelaron tras la fijación durante 2 h en formaldehído.

30 Tras el sacrificio de los animales, se prepararon tejidos (piel dorsal, intestinos delgado y grueso y pulmón) para análisis microscópico. Se llevó a cabo de manera ciega el examen microscópico preliminar de muestras de piel procesadas de manera rutinaria (no se le informó al examinador sobre el comportamiento de rascado o genotipo). En todos los casos excepto uno, los transgénicos pudieron diferenciarse de los controles de tipo natural, siendo la diferencia más prominente la epidermis engrosada en animales transgénicos. El grosor epidérmico era de 55  $\mu\text{m}$  (DE = 21  $\mu\text{m}$ ;  $n = 19$ ) para animales transgénicos, y 15  $\mu\text{m}$  (DE = 2,6  $\mu\text{m}$ ;  $n = 21$ ;  $p < 0,001$ ) para controles. No hubo diferencia estadísticamente significativa en el grosor epidérmico entre los animales transgénicos más jóvenes (7-8 semanas) y mayores (13-14 semanas). Otros hallazgos histológicos frecuentes y prominentes en la piel de animales transgénicos en comparación con los controles (figura 6 A-B) fue una hiperqueratosis marcada, una celularidad aumentada de la parte dérmica de la piel, y grosor epitelial aumentado de estructuras anexas (paredes del folículo piloso y glándulas sebáceas y conductos). El aumento del número de células en el tejido conjuntivo sólo se debió parcialmente a los linfocitos y granulocitos; también parecía haber un aumento del número de células similares a histiocitos y/o fibroblastos. La tinción con azul de toluidino mostró el número aumentado de mastocitos dérmicos en algunos animales transgénicos (resultados no mostrados). No pudieron encontrarse diferencias en secciones teñidas de rutina entre transgénicos y controles para ninguno de los otros órganos examinados (resultados no mostrados).

##### *Inmunohistoquímica*

45 Los análisis inmunohistológicos de muestras de piel de animales transgénicos n.º 1010 y controles de miembros de la camada con anticuerpos específicos para SCCE mostraron un fuerte marcaje de queratinocitos en partes suprabasales de la epidermis interfolicular en transgénicos, incluyendo la capa cornificada engrosada. En folículos pilares y conductos sebáceos sólo se tiñeron las partes lumbinales, incluyendo el revestimiento cornificado de folículos y conductos (figura 6C). Esto contrastó notablemente con células basales de la epidermis interfolicular y las principales partes de folículos pilosos y glándulas y conductos sebáceos, en los que no se vio o se vio un marcaje muy débil por los anticuerpos. En los controles hubo un marcaje relativamente débil de una zona estrecha de la epidermis interfolicular cerca de la transición al estrato córneo, del estrato córneo, y de las partes lumbinales de los folículos pilosos (figura 6D). Este patrón era similar al descrito previamente para la epidermis humana normal (Ekholm *et al.* 1998). Se obtuvieron resultados similares (no mostrados) en muestras congeladas fijadas en formaldehído con microscopía inmunofluorescente.

En los intestinos sólo se observó marcaje específico para SCCE en transgénicos y en células epiteliales distribuidas irregularmente. Las células teñidas eran más numerosas en las puntas de las vellosidades en el intestino delgado y en las partes lumenales del epitelio del colon. En los pulmones de transgénicos se marcaron débilmente partes apicales de células epiteliales bronquiales. A concentraciones de anticuerpo superiores también parecía haber un marcaje difuso del epitelio alveolar (resultados no mostrados para los intestinos y pulmón).

#### *Comparación con piel humana enfermada.*

Se tomaron biopsias de piel de voluntarios humanos y pacientes tras consentimiento informado y con la aprobación del comité ético de investigación en seres humanos, Umeå University. Se tomaron las biopsias de lesiones eccematosas crónicas en los lados flexurales de los antebrazos de cinco adultos con dermatitis atópica y se procesaron para microscopía tal como anteriormente. Se obtuvieron biopsias de sitios correspondientes de voluntarios. En secciones teñidas de rutina (no mostradas) las lesiones mostraron, tal como se esperaba, acantosis marcada, hiperqueratosis, y un infiltrado dérmico escaso que consistía principalmente en linfocitos. La inmunohistología con anticuerpos específicos para SCCE mostró un aumento drástico en el número de capas de células suprabasales marcadas en comparación con los controles (figura 6 E-F). Con respecto a la acantosis, hiperqueratosis y patrón de tinción específica para SCCE las diferencias observadas entre la piel normal y lesionada fueron sorprendentemente similares a las observadas entre la piel de ratones transgénicos n.º 1010 y los controles.

### **EJEMPLO 5**

#### *Ratones transgénicos scce para pruebas de agentes antipruríticos*

Se administraron a ratones transgénicos, de 18-22 semanas de edad, de 24,2 g de peso medio, inyecciones subcutáneas de o bien 250 µg del glucocorticoide acetónico de triamcinolona en un volumen total de 100 µl en el día 0, y 100 µg acetónico de triamcinolona en un volumen total de 100 µl en los días 7, 14 y 21, o bien 100 µl de solución salina fisiológica en los mismos puntos de tiempo. Se contaron los episodios de rascado por la mañana y las inyecciones se administraron por la tarde. Para preparar disoluciones para inyecciones se mezclaron 25 µl o 10 µl de suspensión Kenacort -T™, 10 mg/ml (de Bristol-Myers Squibb), con 75 µl o 90 µl de solución salina fisiológica. Los resultados se muestran en la figura 7. El acetónico de triamcinolona fue altamente eficaz en la disminución del rascado.

Se administró a ratones transgénicos de 20-21 semanas de edad, de 24,5 mg de peso medio, o bien loratadina en un volumen total de 100 µl, o bien 100 µl de una disolución control por medio de alimentación por tubo. Se contaron los episodios de rascado inmediatamente antes de la alimentación (0 horas), y entonces en los puntos de tiempo indicados. Se prepararon las disoluciones de alimentación mezclando o bien 30 µl de loratadina 1 mg/ml, sacarosa 600 mg/ml (Clarityn mixture™, de Schering-Plough), o bien, para disoluciones control, 30 µl de sacarosa 600 mg/ml, con 70 µl de solución salina fisiológica. Los resultados se muestran en la figura 8A. Entonces se trataron los mismos ratones 7 días después con 90 µl de mezcla de loratadina de disolución de sacarosa mezclada con 10 µl de solución salina fisiológica. Los resultados se muestran en la figura 8B. Tal como se observa en las figuras 8A y 8B no hubo diferencia significativa en la frecuencia de rascado entre grupo tratamiento y grupo control. Esto indica que el comportamiento de rascado del ratón con SCCE no se alivia mediante el tratamiento con un antihistamínico.

Los dos experimentos muestran que pueden usarse ratones transgénicos scce para la evaluación de fármacos con posibles efectos sobre el picor (fármacos antipruríticos). El glucocorticoide acetónico de triamcinolona pareció ser altamente eficaz en aliviar el picor, mientras que el antihistamínico loratadina no tuvo efecto antiprurítico estadísticamente significativo.

Por tanto parece que el prurito en ratones transgénicos con SCCE responde al tratamiento con un glucocorticoide pero no al tratamiento con un antihistamínico. Puede encontrarse una situación similar con los pacientes humanos que padecen de prurito asociado por ejemplo con dermatitis atópica, eccema y psoriasis.

### **EJEMPLO 6**

#### *Determinación de las secuencias de nucleótidos de homólogos de ADNc de hscce de vaca, rata y cerdo.*

Se obtuvieron biopsias de piel de vaca, cerdo y rata, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se homogeneizaron, usando un instrumento Mikro-Dismembrator U (B.Braun Biotech International GmbH, Melsungen, Alemania) a 2000 rpm durante 45 s. Se aisló ARN usando 1 ml de reactivo Trizol (Life Technologies AB, Täby, Suecia) según las instrucciones del fabricante, se trataron con ADNasa, se extrajeron con fenol:CHCl<sub>3</sub>, y se precipitaron con LiCl según el protocolo de Boehringer Mannheim (Nonradioactive in Situ Hybridization application Manual, Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania).

Se realizó la RT-PCR tal como se describe (Lindström *et al.*) con cebadores oligo d(T)<sub>16</sub> (Perkin Elmer, Foster City, CA, EE. UU.) en la reacción de RT. En cada reacción de RT se usaron 100 ng de ARN total.

- 5 Para la PCR, se diseñaron cinco cebadores a partir de secuencias conservadas encontradas en el ADNc de *hscce* y *mscce* dando como resultado cebadores mS3, 698, 696, H2 y mS4 (tabla 4). Se clonaron los productos de PCR dentro de un vector pCR II usando el kit de clonación TOPO TA (Invitrogen/NOVEX, Groeningen, Países Bajos) tal como se recomienda por los fabricantes. Se aisló ADN del plásmido usando el kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen, Chatsworth, CA). Se realizó la secuenciación de nucleótidos usando el kit DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech Sverige, Uppsala, Suecia) y un secuenciador de ADN automatizado ABI377 (Perkin-Elmer).
- 10 Para obtener el extremo de ADNc 5' se usó el kit de amplificación de ADNc SMART Race (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, Ca) según las instrucciones del fabricante. Se diseñaron cebadores específicos de especie a partir de las secuencias de ADNc obtenidas en las etapas previas (tabla 4).

Tabla 4. Oligómeros usados en la RT-PCR, 5'-RACE y 5'-RACE anidada. Se diseñaron los cebadores de oligómeros a - e a partir de las secuencias conservadas encontradas cuando se comparan las secuencias de ADNc de SCCE y mSCCE. Las posiciones se derivan del ADNc de mSCCE (Bäckman *et al.*), se diseñaron los oligómeros f - j basándose en la información de secuenciación de nucleótidos de las reacciones de clonación específicas de especies anteriores.

Oligómero	Secuencia, de 5' a 3'	
a) mS3	CAAGGAGAAAGGATTATAGATGGCT	(SEQ ID NO: 31)
b) 698	AAGGCTCCGCACCCATGGCAG	(SEQ ID NO: 32)
c) 696	TGCAATGGTGA CT CAGGGGGCCCTT	(SEQ ID NO: 33)
d) H2	GACCCAGGCGTCTACTCAAGT	(SEQ ID NO: 34)
e) mS4	GAGACCATGAAAACCCATCGCTAAC	(SEQ ID NO: 35)
f) KO0905	TGACTTTCTTCACACTGGACGACAGC	(SEQ ID NO: 36)
g) GR0905	CTTCACACTGGCTGATAGCCTGGCCG	(SEQ ID NO: 37)
h) Ngr	CAGGGTGGCGGAATGACCTCATGGCCCT	(SEQ ID NO: 38)
i) RÅ1016	CTACTCCACAAGGACCCATGTCAATGAC	(SEQ ID NO: 39)
j) nRÅ1016	GCTGTGTGCTGGCATTCCCGACTCTAAG	(SEQ ID NO: 40)

- 15 Se preparó la primera cadena de ADNc a partir de ARN total usando oligonucleótido SMART II (5'-AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACGCGGG- 3') (SEQ ID NO: 41) y cebador de síntesis de ADNc 5'-RACE (5'-(T)<sub>25</sub> N<sub>1</sub>N-3') (N = A, C, G, o T; N<sub>1</sub> = A, G, o C) (SEQ ID NO: 42). Se realizó el 5'-RACE usando mezcla de cebador universal (UPM) que contiene cebador universal largo (0,02 μM) (5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT-3') (SEQ ID NO: 43) y corto (1 μM) (5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCC-3') (SEQ ID NO: 44) y un cebador específico para cada especie (KO 0905, GR 20 0905 y RÅ 1016). Los parámetros de ciclo para la reacción de PCR se adaptaron a partir de las recomendaciones del fabricante para un termociclador de ADN 480 de Perkin-Elmer pero con 25 ciclos en la última etapa. Se sometieron a PCR anidada los productos de PCR de 5'-RACE de las reacciones con cebadores específicos para cerdo y rata usando un cebador universal anidado (NUP) (5'-AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT-3') (SEQ ID NO: 25 45) y cebadores específicos anidados para cerdo (nGR0905) y rata (nRÅ1016) respectivamente. Se realizaron las reacciones de PCR anidada según las instrucciones del fabricante con 20 ciclos de amplificación. Se comprobaron los productos de 5'-RACE y 5'-RACE anidada en gel de agarosa. Para la caracterización, los productos se clonaron y secuenciaron tal como se describió anteriormente. Los resultados se muestran en la tabla 5 como secuencias de aminoácidos deducidas. La tabla 6 muestra las similitudes calculadas de la enzima activa empezando con la 30 secuencia IIDG. Se incluyen las secuencias para SCCE humana (Hansson *et al.*, 1994) y de ratón (Bäckman *et al.*, 1999) para comparación.

La secuencia de SCCE de rata mostrada en la tabla 5 y en SEQ ID NO: 49 no puede encontrarse en la base de datos de GenBank lo que indica que no corresponde a ninguna de las proteínas similares a la calicreína o calicreínas de rata ya conocidas.

5 Tabla 5. Alineación de las secuencias de aminoácidos deducidas de SCCE a partir de cinco especies. Las secuencias para vaca, cerdo y rata no están completas en las partes C-terminales.

```

seq2  ----MTTPLVILLLLTFALGSVA QEDQGNKSGEKIIDGVPCPRGSQFPWQVALLKGSQQLHCG 56
seq3  MARPLLPPRLIILLLSLALGSAA QEGQ-DKSGEKIIDGVPCPGSRPWQVALLKGNQLHCG 59
seq1  MARSLLLPLQIILLLSLALETAG EEAQ----GDKIIDGAPCARGSHFPWQVALLSGNQLHCG 56
seq4  -MGVWLLSLLTVLLSLALETAG Q-----GERIIDGYKCKEGSHFPWQVALLKGDQLHCG 52
seq5  -MGVWLLSLITVLLSLALETAG Q-----GERIIDGIKCKEGSHFPWQVALLKGNQLHCG 52

seq2  GVLLNEQWVLTAAHCMN-EYNVHMGSVRLVGG--QKIKATRSFRHPGYSTQTHANDLMLV 112
seq3  GVLVNQQWVLTAAHCMNDYINVHLGSDRLDDRKGQKIRAMRSFRHPGYSTQTHVNDLMLV 119
seq1  GVLVNERWVLTAAHCKMNEYTVHLGSDTLGDRRAQRIKASKSFRHPGYSTQTHVNDLMLV 116
seq4  GVLVGESWVLTAAHCKMGQYTVHLGSDKIEDQSAQRIKASRSFRHPGYSTRTHVNDIMLV 112
seq5  GVLVDKYWVLTAAHCKMGQYQVQLGSDKIGDQSAQKIKATKSFRHPGYSTRTHVNDIMLV 112

seq2  KLNGRAKLSSSVKKNLPSHCDFPGTMCTVSGWGTTTTSPDVTFFPGQLMCTDVKLISPQDC 172
seq3  KLSRPARLSASVKKVNLPSRCEPPGTTCTVSGWGTTTTSPDVTFFADLMCTDVKLISSQDC 179
seq1  KLSQARLSSMVKKVRLPSRCEPPGTTCTVSGWGTTTTSPDVTFFSDLMCVDVKLISPQDC 176
seq4  KMDKPVKMSDKVQKVKLPDHCEPPGTLCTVSGWGTTTTSPDVTFFSDLMCSVKLISSQEC 171
seq5  RLDEPVKMSKVEAVQLPEHCEPPGTSCTVSGWGTTTTSPDVTFFSDLMCSVKLISSREC 172

seq2  RKVYKDLLGDSMLCAGI PNSRTNACNGDSGGPLMCKGTLQGVVSWGSPCGQPNDFGVYT 232
seq3  KKVYKDLLGSSMLCAGI PNSKTNACNGDSGGPLVCKGTLQGLVSWGTFPCGQPNDFGVYT 239
seq1  TKVYKDLLENSMLCAGI PDSKKNACNGDSGGPLVCRGTLQGLVSWGTFPCGQPNDFGVYT 236
seq4  KKVYKDLLGKTMLCAGI PDSKTNTCNGDSGGPLVCNDTLQGLVSWGTYPCGQPN----- 225
seq5  KKVYKDLLGKTMLCAGI PDSKTNTCNGDSGGPLVCNDTLQGLASRGTYPCGQPNDFGVYT 232

seq2  QVCKYVNWIK----- 242
seq3  QVCKYIDWIN----- 249
seq1  QVCKFTKWINDTMKKHR 253
seq4  -----
seq5  QVCKYKRWMETMKTTHR 249
    
```

La Seq 2 (vaca) en la figura es SEQ ID NO:46, Seq 3 (cerdo) en la figura es SEQ ID NO:47, Seq 1 (homo) en la figura es SEQ ID NO:48, Seq 4 (rata) en la figura es SEQ ID NO:49 y Seq 5 (ratón) en la figura SEQ ID NO:50.

Tabla 6. Similitudes calculadas de las enzimas activas.

especies comparadas	similitud calculada*
Ratón-ser humano	75%
Rata- ser humano	77%
Cerdo- ser humano	77%
Vaca- ser humano	76%
Rata-ratón	88%



(continuación)

Vaca-ratón	69%
Cerdo-ratón	69%

---

\*Las comparaciones de enzimas activas empiezan con la secuencia IIDG etc.

---

**Lista de secuencias**

- 5 <110> Egelrud, Torbjorn Hansson, Lennart
- <120> Mamíferos transgénicos modificados con SCCE y su uso como modelos de enfermedades humanas
- <130> P26024PC01
- <150> PA 2001 00218
- <151> 09-02-2001
- 10 <150> CA 2.332.655
- <151> 09-02-2001
- <160> 50
- <170> FastSEQ para Windows versión 4.0
- <210> 1
- 15 <211> 986
- <212> ADN
- <213> *Homo sapiens*
- <220>
- <221> CDS
- 20 <222> (25)...(786)
- <400> 1

ES 2 369 659 T3

```

gaattccgcg gatttccggg ctccatggca agatcccttc tctgcccct gcagatccta 60
Met Ala Arg Ser Leu Leu Leu Pro Leu
1 5

ctgctatcct tagccttggg aactgcagga gaagaagccc aggtgacaa gattattgat 120
Gln Ile Leu Leu Leu Ser Leu Ala Leu Glu Thr Ala Gly Glu Glu Ala
10 15 20 25

ggcgccccat gtgcaagagg ctcccaccca tggcaggtgg ccctgctcag tggcaatcag 180
Gln Gly Asp Lys Ile Ile Asp Gly Ala Pro Cys Ala Arg Gly Ser His
30 35 40

ctccactgcg gaggcgtcct ggtcaatgag cgctgggtgc tcaactgccgc ccaactgcaag 240
Pro Trp Gln Val Ala Leu Leu Ser Gly Asn Gln Leu His Cys Gly Gly
45 50 55

atgaatgagt acaccgtgca cctgggcagt gatacgtgg gcgacaggag agctcagagg 300
Val Leu Val Asn Glu Arg Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Lys Met
60 65 70

atcaaggcct cgaagtcatt ccgccacccc ggctaactcca cacagacca tgттаатgac 360
Asn Glu Tyr Thr Val His Leu Gly Ser Asp Thr Leu Gly Asp Arg Arg
75 80 85

ctcatgctcg tgaagctcaa tagccaggcc aggctgtcat ccatggtgaa gaaagtcagg 420
Ala Gln Arg Ile Lys Ala Ser Lys Ser Phe Arg His Pro Gly Tyr Ser
90 95 100 105

```

ES 2 369 659 T3

ctgccctccc gctgcgaacc ccctggaacc acctgtactg tctccggctg gggcactacc 480  
 Thr Gln Thr His Val Asn Asp Leu Met Leu Val Lys Leu Asn Ser Gln  
                   110                                  115                                  120

acgagcccag atgtgacctt tccctctgac ctcatgtgcg tggatgtcaa gtcacatctcc 540  
 Ala Arg Leu Ser Ser Met Val Lys Lys Val Arg Leu Pro Ser Arg Cys  
                   125                                  130                                  135

ccccaggact gcacgaaggt ttacaaggac ttactggaaa attccatgct gtgcgctggc 600  
 Glu Pro Pro Gly Thr Thr Cys Thr Val Ser Gly Trp Gly Thr Thr Thr  
                   140                                  145                                  150

atccccgact ccaagaaaaa cgcttgcact ggtgactcag ggggaccggt ggtgtgcaga 660  
 Ser Pro Asp Val Thr Phe Pro Ser Asp Leu Met Cys Val Asp Val Lys  
                   155                                  160                                  165

ggtaccctgc aaggtctggt gtctctggga actttccctt gcggccaacc caatgacca 720  
 Leu Ile Ser Pro Gln Asp Cys Thr Lys Val Tyr Lys Asp Leu Leu Glu  
                   170                                  175                                  180                                  185

ggagtctaca ctcaagtgtg caagttcacc aagtgataa atgacaccat gaaaaagcat 780  
 Asn Ser Met Leu Cys Ala Gly Ile Pro Asp Ser Lys Lys Asn Ala Cys  
                   190                                  195                                  200

cgctaacgcc aactgagtt aattaactgt gtgcttccaa cagaaaatgc acaggagtga 840  
 Asn Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Arg Gly Thr Leu Gln Gly  
                   205                                  210                                  215

ggagccgat gacctatgaa gtcaaatttg actttacctt tcctcaaaga tatatttaa 900  
 Leu Val Ser Trp Gly Thr Phe Pro Cys Gly Gln Pro Asn Asp Pro Gly  
                   220                                  225                                  230

cctcatgccc tgttgataaa ccaatcaaat tggtaaagac ctaaaaccaa aacaaataaa 960  
 Val Tyr Thr Gln Val Cys Lys Phe Thr Lys Trp Ile Asn Asp Thr Met  
                   235                                  240                                  245

gaaacacaaa accctcaacg gaattc 986  
 Lys Lys His Arg \*  
 250

<210> 2

<211> 253

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

ES 2 369 659 T3

Met Ala Arg Ser Leu Leu Leu Pro Leu Gln Ile Leu Leu Leu Ser Leu  
 1 5 10 15  
 Ala Leu Glu Thr Ala Gly Glu Glu Ala Gln Gly Asp Lys Ile Ile Asp  
 20 25 30  
 Gly Ala Pro Cys Ala Arg Gly Ser His Pro Trp Gln Val Ala Leu Leu  
 35 40 45  
 Ser Gly Asn Gln Leu His Cys Gly Gly Val Leu Val Asn Glu Arg Trp  
 50 55 60  
 Val Leu Thr Ala Ala His Cys Lys Met Asn Glu Tyr Thr Val His Leu  
 65 70 75 80  
 Gly Ser Asp Thr Leu Gly Asp Arg Arg Ala Gln Arg Ile Lys Ala Ser  
 85 90 95  
 Lys Ser Phe Arg His Pro Gly Tyr Ser Thr Gln Thr His Val Asn Asp  
 100 105 110

Leu Met Leu Val Lys Leu Asn Ser Gln Ala Arg Leu Ser Ser Met Val  
 115 120 125  
 Lys Lys Val Arg Leu Pro Ser Arg Cys Glu Pro Pro Gly Thr Thr Cys  
 130 135 140  
 Thr Val Ser Gly Trp Gly Thr Thr Thr Ser Pro Asp Val Thr Phe Pro  
 145 150 155 160  
 Ser Asp Leu Met Cys Val Asp Val Lys Leu Ile Ser Pro Gln Asp Cys  
 165 170 175  
 Thr Lys Val Tyr Lys Asp Leu Leu Glu Asn Ser Met Leu Cys Ala Gly  
 180 185 190  
 Ile Pro Asp Ser Lys Lys Asn Ala Cys Asn Gly Asp Ser Gly Gly Pro  
 195 200 205  
 Leu Val Cys Arg Gly Thr Leu Gln Gly Leu Val Ser Trp Gly Thr Phe  
 210 215 220  
 Pro Cys Gly Gln Pro Asn Asp Pro Gly Val Tyr Thr Gln Val Cys Lys  
 225 230 235 240  
 Phe Thr Lys Trp Ile Asn Asp Thr Met Lys Lys His Arg  
 245 250

<210> 3

<211> 9729

5 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 3

ES 2 369 659 T3

taccacattt tcttaatcca gtctatcact gatggacatt taggttgatt ccctgtgttt 60  
gctgttgca atagttctac aatgaacgta cgtgtccatg tgtctttaa cagaatgatt 120  
tatattcctt tgggtacaca cactggggct tatgagaggg tggagagtgg gaggaaggag 180  
aggatcagaa aaaaataact aatgggtact aggcttaata cctgggtgat taaataatct 240  
gtataacaaa ccccatggc gcacgttcac ctacgcaaca aacctgcaca tcctgcacat 300  
gtacccccga actgaaaagt taaaaaaaga aaaataaata tttgcttata aattaataaa 360  
tgaagccctc aaaaatgttc tattagataa tgtaagtac agacattttt gttataaata 420  
cataatatac aaagaatct atgtataaca tgattaaaat gaccataaga acatagatcc 480  
taaacatggc aatattagt ggggtggggt tagggaaagc gttgttttta acttacacct 540  
ctctgttaga gttgggaatg ggttcaggcg taattacagg cacgactggg atcagcttgg 600  
acaagttoce ccaggcgggc cagaattagg atgtagggtc taggccacc ctagaggggg 660  
gtgagggcaa gaaaatggcc ccagaagccg ggcgcagtgg ctcacgcctg taatcccagc 720  
actttgcggg gccgagggcg gcacatcatg aggtcaggag atcgagacca ttctggcca 780  
catagtgaaa cccgtctct actaaaaata caaaaattat ctgggagtgg tggtgctgc 840  
ctgtaatccc aggtactcgg gaggtcagg caggagaatc actgaaacct gggagccgga 900  
gctggcagtg agccgagatc gcgccaccgc actccagcct ggcgatagag agagactcca 960  
tccaaaaaaa agaaaggaag ggagggagg aggaggaag aaagaaagaa aaccgcccc 1020  
gagaaggacc cgagccagag cctattctct gagctcagcg actgcttga tcccgtcct 1080  
gccctcaga cccagcgac cgggtccctc ccccgagagc agccaggagg gactgtggga 1140  
ccagaatgtg cggggcgca ggagctgggc accgccgctc cttcggaggg aggtggaga 1200  
gagagtgcag tggtgcaat tgctctcgt gcgtcagggt tccagataac cagaaccgca 1260  
aatgcaggcg ggggtgccc agagtcggct ccgctgcac cccagggcgc tggggccggg 1320  
catggggcgg ggggtgatat aagaggacgg cccagcagag ggctgaagat tttggagccc 1380  
agctgtgtgc cagcccaagt cggaacttgg atcacatcag atcctctcga ggtgagaaga 1440  
ggctcatca aggtgcacc tgtaggggag ggggtgatgc tggctccaag cctgactctg 1500  
ctctcgagag gtagggctg cagcctagac tcccggctct gagcagtgag ggctggaag 1560  
tctgcaattt gggcctttt agggaaaaac gaactacaga gtcagaagt tgggtccac 1620  
agggaagggc aagatcggag cctagattcc tgggtctcta gggatctgaa gaacaggaat 1680  
ttgggtctg agggaggagg ggctggggtt ctggactcct gggctgagg gaggaggcc 1740  
tggggcctg gactcctgg tctgagggag gaggggctgg ggtctcgac tcctgggtct 1800  
gaggaggag gggctgggg cctggactcc tgggtctgag ggaggaggg ctgggacctg 1860  
gactcctagg tctgagggag gaggagctgg ggcctggact cctgggtctg agggaggagg 1920  
ggctggggcc tggactcct ggtctgagg aggatgggtc gaggcctaga ctctgggtc 1980  
tgaggagga ggggtgggg cctggactcc tgggtctgag ggaggaggg ctggagcctg 2040  
gactcctggg cctgagggag gagggactga gacctggact cctaggtctg agggaggagg 2100

gactgggacc tggactcctg ggtctgaggg aggaggagct gggggcctgg actcctgggt 2160  
ctgagggagg cggggctggg ggcctggact cctgggtctg agggaggagg ggttggggcc 2220  
tggactcctg agcctgaggg aggagggact tggacctgga ctcctaggtc tgaggaggga 2280  
ggagctgggg gcctggactc ctaggctctga gggaggaggg gctggggggc tggactcctg 2340  
ggtctgaggg aggaaggtgc tagggtctgg actcttgggt atgaggaggagg aggaggttag 2400  
gggtctggac ttctgagtgt aaggaaggag aggccagaga aaggaatttc tgggtctgag 2460  
ggaggagggg ctggggttct ggaccctag gtctgagggg ggaggggctg gggcctggac 2520  
tcctgggtct gtggggggag gggctggggc ctggaccctt gggctgagt ggggaggggc 2580  
tgggcctgaa tgctttctcc ttctcagctc cagcaggaga ggcccttctt cgctggcag 2640  
ccccgagcg gctcagcagg gcaccatggc aagatccctt ctctgcccc tgcatctct 2700  
actgctatcc ttagccttgg aaactgcagg agaagaaggt gaaagctgga ctgggaagtc 2760  
tgacctcacc tcagggcccc cactgaccct ctccaaggag tcctgagtc agaaccctt 2820  
cctcctcaaa cagcttccat cctgggagga ccagactgtc ggctgaagcc cccgctctt 2880  
ctgcttctgc tgactcaggg ggtctctgtc cctccagggc cctgcctcct gtgctcaggg 2940  
tctctctgtg gttccccaga tgagatgctc ctctgggtt tctgagtggg ctctctctgt 3000  
ctgtctctat cctctctctt tgctttctct gtattttctc acacattttt atctgtctct 3060  
gtccatctct gactctggga atcctgagg tgcagcctca gccttcccc atgctagct 3120  
accacatgc tcctccatgt ctccatccag cccaggggta caagattatt gatggcgccc 3180  
catgtgcaag aggtccccac ccatggcagg tggccctgct cagtggcaat cagctccact 3240  
gcggaggcgt cctggtcaat gagcgtggg tgctcaactgc cgccactgc aagatgaagt 3300  
aggtgccacc caagtctctg ctggaggtgc gccagcatct ccagctcgt atgggggtgg 3360  
aagggcagtc tttctgtgcc tacggctcta ttctctctc tctgggtctc tgtccccctc 3420  
tctctgggccc ctgtacccc ctctccctgg ggtctgtctc cctctctctc ctggctctct 3480  
gtctcctct ctctgggtct ctgtccccct ctctctggat ctctgttccc ctctctctgt 3540  
gtctctgtcc cccattctct ctaggctctct gttccccctc ctctctctct gggctctctgt 3600  
ccctctctct ctgggtctct tccccctctc tctctggate tctgtcccc tctccctggg 3660  
cctctgtacc cctctccctt ggggtctctgt cccccctctc tgggtctctg tctgcctttc 3720  
tctctggate tctgttcccc tctgtgtctc tgtccccctc tctctctggg tctctgttcc 3780  
ccctctctct tttctgggtc tctgtcccctc tctctctggg tctctgtccc cctctctctc 3840  
tgggtctctgt tccccctct ctctctctgg tctctgtccc tctctctctg ggtctctgtc 3900  
accctctctc tctgggtctc tgtcaccctc tctctctggt ctctgttccc cctctctct 3960  
ctgtgggtct ctgtccctct ctctctgggt ctctgttccc ctctctctct ggtctctgtt 4020  
ccccctctc tetctccgga tctctgtccc cctctccctg gggctctgtc cccctctctc 4080  
cctgtctctc tgttctctc tctctggggc tctgtcccc tetctctctg gtctctgtc 4140  
ccctctctct ggtctctgt cctctctct ctgggtctct gtcccctct ctctggatct 4200  
ctgtccccct ctccctgggc ctctgtaccc cctctccctg gggctctgtc cccctctctc 4260  
tgggtctctg tctgcctttc tctctggatc tctgttcccc tctgtgtctc tgtccccctc 4320  
tctctctggg tetctgttcc cctctctctc tttctgggtc tctgtcccctc tctctctggg 4380  
tctctgtccc cctctctctc tgggtctctgt tccccctct ctctctctgg tctctgtccc 4440  
tctctctctg ggtctctgtc accctctctc tctgggtctc tgtcaccctc tctctctggt 4500  
ctctgttccc cctctctct ctgtgggtct ctgtccctct ctctctgggt ctctgttccc 4560  
ctctctctct ggtctctgtt cccccctctc tctctccgga tetctgtccc cctctccctg 4620  
gggtctctgt cccctctctc cctggctctc tgtcttctc tetctggggc tctgtcccc 4680  
tctctctctg gtctctgttc cctctctct gggtctctgt cctctctct ctgggtctct 4740  
gtcccctct ctctggatct ctgtccccct ctctctctgg gtctctgtc cctctctct 4800  
gggtctctgt cccctctct ctctctgtgt ctctctcccc ctctctctc tgtgtctctg 4860  
tccccctctc tatctctgtg tctctctccc cctctctctc tctgggtctc tgtccccccc 4920  
tctctgggtc tctgtctccc tctctctggg gctctgtccc cctctctctc tggatctctg 4980  
ttccccctc tctgggtctc tgtctcccct cctctctctg tgtctctgtc cccccctctc 5040  
tctctgggtc tctgtcccca ccccgcccc caggtctttg cacaccctct ctgtcacagt 5100  
gtctcttctg aatctgtgaa tgtcaactct cgcagtgagt acaccgtgca cctgggcagt 5160  
gatacgtgg gcgacaggag agctcagagg atcaaggcct cgaagtcatt ccgccacccc 5220  
ggctactcca cacagaccca tgtaaatgac ctcatgctcg tgaagctcaa tagccaggcc 5280  
aggctgtcat ccatggtgaa gaaagtcagg ctgccctccc gctgcaacc ccttgaacc 5340  
acctgactg tctccggctg gggcactacc acgagcccag atggtaggtg gcctcagtg 5400  
cccaggagtg caggccccag cctcctccc tcagaccccag gactccaggc ccccagcccc 5460  
tcctcctca gaccaggag tccaggctc agccccctct cctcagacc caggagtcca 5520  
ggccccagc cctcctccc tcagaccccgc gagtccagac cccagcccc cctcctcag 5580  
accagcagt cctgggcccc agaccctct cctcggaac caggagcctg aacaacagcc 5640  
cttctgggtc tcgccccat cctctctgac tgacagctct cctgctcct cctgcagtg 5700  
acctttccct ctgacctat gtgctggat gtcaagctca tctccccca ggactgcagc 5760

aaggtttaca aggacttact ggaaaattcc atgctgtgcy ctggcatccc cgactccaag 5820  
 aaaaacgcct gcaatgtgag accctccccc ccaattcctc cccagtcctg ggtaccctgt 5880  
 ctgcatgccc cagggacaga gcttgaccca agtgactggg taccaagccc ggccttgccc 5940  
 tccccccagg cctggcctcc tcagcttttt ccacctcatt ctctgcctag gtcaggggtg 6000  
 ggagtttact taggggccga tgtggccctg gggatgggac agagagttta ataggggtga 6060  
 gaaagtgggg gtgggaccag ggaaggagac tgagggtgctg gcctcaggcc caaacctaa 6120  
 gggggcacca aaaacctcag tgattgagat aaatcataat gcaatattta aaaataaaaa 6180  
 taaaaactca tgcagaagtc catgatggac aaaatgtcac attttaata aagagcaggt 6240  
 ggatcttact gaattttccc ttgccgtaag tactagcgtg gctcagcaca gcgctgtact 6300  
 ggcactgtct tcatthaaaa tgtggatacc atgcccataca tgcagtttta tgtattacat 6360  
 ttgatttugt taagtactgc attgaagtat tgtgtattgc agttactgag attttgtgccc 6420  
 tgaagctgat gactcactca cctgaccctg gccctggctc cggggaaaac actctttctc 6480  
 tccactcctc ctctgttccc ttttctggtc cttttgtcat cccctctggt tctgaacagt 6540  
 cttcccacat ctctctttgt gacataattt cahttcattc ttttctctt tgtttttct 6600  
 ctgtgttgag cttagcttgt ctccctccct tgttctctct ccatgccctc ctctctgctc 6660  
 tctgtcttct cctcttttct cttgcttctc tctctctctc cccctccctc tctctctctc 6720  
 ctgccccctc gctctctctt ttttctctc tctctgtctc ctctctggcc ctctctctt 6780  
 tctctctctc cccacttct ctgtctctct tcatctctct cctcatctc tcttggccc 6840  
 ctcttttta ctgtctctct ctttctctt cttctatctc tctctctcc ccgcccctc 6900  
 ccatctctg tctttcttcc tctctcttta ttctctctc ctcttccagt ctctctctc 6960  
 tctccccacc cccaccccat ctctctcccc acaccttccc cccctttctc tttgtctctc 7020  
 tcttctacct ctttcttctc cacccccate tctctctctc ttctcttccc acacctctc 7080  
 catctcctc atctctttgt ctgtctctct tctcctctc tcttttccac ccccatctct 7140  
 ctgtctctct ctctccccat acccttccc tcttctctc ctctctttgt ctctctctc 7200  
 tttccctctt tcttctccac ctccaactct ctctgtctct ccacaccat cctccttgt 7260  
 cacatctgca ccttcagctg tcaggggatg tgggatggtg agtggtaggg atagaggaga 7320  
 tgggagagag atgactgtcc tagagaatag ggtgttcccc ttctcccctg gtgagggcca 7380  
 gtttcatgaa tgtgcaagct ctgcacggac acagagcccc aactcagaa gggctcaaa 7440  
 cttagtctaa tgcattcctg ctgttgtctt gaaattctca ataattttg aacaaagggc 7500  
 cctgcatttt cgttttgcac caagtccctgt aaattatgta actggctctc accctggct 7560  
 ccgagaccat cgtgtccccc tttcctgccc cacagggcac gcatccacc cttggagatg 7620  
 atgttcttcc tcccactagc ttggagcagg gtccttaaca ttggaaaata aagagtgtc 7680  
 tgatcctgga agccccacc cttctctgca attggtctca ttggccaagg gtcaaaccag 7740  
 tgtcttcaa ggacctagt tgtccctgca actagctc ccatagtcc ccagataca 7800  
 tgactctct ctcatggct atgggtggaag tccataatct gcaagacaaa gaccgatac 7860  
 tgaggaatgt atgagaatga gttgggcttt gatctgaagc caaagttaat ctccggctct 7920  
 attcctctca gggtgactca gggggaccgt tgggtgtgag aggtaccctg caaggtctgg 7980  
 tgcctgggg aactttccct tgcggccaac ccaatgacc aggagtctac actcaagtgt 8040  
 gcaagttcac caagtggata aatgacacca tgaaaaagca tcgctaacgc cacactgagt 8100  
 taattaactg tgtgcttcca acagaaaatg cacaggagtg aggacgccga tgacctatga 8160  
 agtcaaattt gactttacct ttctcaaaag atatatttaa acctcatgcc ctgttgataa 8220  
 accaatcaaa ttggtaaaga cctaaaacca aaacaaataa agaaacaaa aaccctcagt 8280  
 gctggagaag agtcagttag accagcactc tcaaacactg gaactggacg ttcgtacagt 8340  
 ctttacggaa gacacttggc caacgtacac cgagaccctt attcaccacc tttgaccag 8400  
 taactctaat cttaggaaga acctactgaa acaaaaaaaa tccaaaatgt agaacaagc 8460  
 ttgaatttac catgatatta tttatcacag aaatgaagtg aaaccatcaa acatgttcca 8520  
 aaagtaccag atggcttaaa taatagtctg gcttggcaca acgatgtttt ttttcttga 8580  
 gacagagtct ctgttgcttg ggctgcaatg cagtgatgca atcttggctc actgcaacct 8640  
 ccgctcctg ggttcaagtg attctcgtgc ttcagcctcc caagtacctg ggactacagg 8700  
 tgtgcaccac cacaccaggc taattttttg tgtattttta ctagagacag ggtttacca 8760  
 tgttggccag cgtggtcttg aacgcctgac ctgagatgat ccaccacct tggcctcca 8820  
 aagtgtggyg attacaggca tgagccacca cggccagccc acaatgatat taaaaaccta 8880  
 ttaaaaatga tacttagaca gaattgtcag tattattcaa gaacatttag gctataggat 8940  
 gttaaatgac aaaaggaagg acaaaaatat atatgtatgt gaccctacc ataaaaaatg 9000  
 aatattcac agaactcagat ctgaaaacac atgtcccaga ctgcatact gggctcgtc 9060  
 gagggtctc cttccttctg tgtacttttc cttgaatgtg cacttttata acatgaaaa 9120  
 taaaggtggg gaaaaaagt cgaagatcta agattggaga gaggtgacct ttcaggaagg 9180  
 gagactagaa agaaatatgt gcctggtttt gagccctggt cctgcccggc ctgttccagg 9240  
 gcatatttcc atttcccaga tctcagtttt tctgtctgt aaaatgggag agagaggaaa 9300  
 ggatggagag aggaagaagg aaggaggag ggaggagaga acaggccaac tcatcagcg 9360  
 tgggaagggg tgtgaaagt tttctgagca tctcacgagt gacaagtgag gaggaggct 9420

ES 2 369 659 T3

```
ggcggttttc agagggattg ggatgacagt agacaggaca caggggtccc acaggggtct 9480
gccagaagta agcaaacagt gccggaggaa gatggtggca cctgctcccc aagaaggag 9540
ggaaaggaac ctcggaagc gggtaggatg agggaggagt cctctgtgac tcagagcctg 9600
gccacagccc cagccatcta acatcaaaga tcctctgtgt ggtcacacct cagacgctgc 9660
tgaccgagga gccactccag cccaggacac gccctctac ctgttcttcc tgtttttctc 9720
ccagaattc 9729
```

<210> 4

<211> 23

<212> PRT

5 <213> *Bos taurus*

<400> 4

```
Ala Gly Ile Pro Asn Ser Arg Thr Asn Ala Cys Asn Gly Asp Ser Gly
  1           5           10           15
Gly Pro Leu Met Cys Lys Gly
                20
```

<210> 5

<211> 23

10 <212> PRT

<213> *Sus scrofa*

<400> 5

```
Ala Gly Ile Pro Asn Ser Lys Thr Asn Ala Cys Asn Gly Asp Ser Gly
  1           5           10           15
Gly Pro Leu Val Cys Lys Gly
                20
```

<210> 6

15 <211> 23

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 6

```
Ala Gly Ile Pro Asp Ser Lys Lys Asn Ala Cys Asn Gly Asp Ser Gly
  1           5           10           15
Gly Pro Leu Val Cys Arg Gly
                20
```

20 <210> 7

<211> 23

<212> PRT



<213> *Rattus norvegicus*

<400> 7

Ala Gly Ile Pro Asp Ser Lys Thr Asn Thr Cys Asn Gly Asp Ser Gly  
 1 5 10 15  
 Gly Pro Leu Val Cys Asn Asp  
 20

<210> 8

5 <211> 23

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 8

Ala Gly Ile Pro Asp Ser Lys Thr Asn Thr Cys Asn Gly Asp Ser Gly  
 1 5 10 15  
 Gly Pro Leu Val Cys Asn Asp  
 20

10 <210> 9

<211> 38

<212> PRT

<213> *Bos taurus*

<400> 9

Gln Glu Asp Gln Gly Asn Lys Ser Gly Glu Lys Ile Ile Asp Gly Val  
 1 5 10 15  
 Pro Cys Pro Arg Gly Ser Gln Pro Trp Gln Val Ala Leu Leu Lys Gly  
 20 25 30  
 Ser Gln Leu His Cys Gly  
 35

15

<210> 10

<211> 37

<212> PRT

<213> *Sus scrofa*

20 <400> 10

Gln Glu Gly Gln Asp Lys Ser Gly Glu Lys Ile Ile Asp Gly Val Pro  
 1 5 10 15  
 Cys Pro Gly Gly Ser Arg Pro Trp Gln Val Ala Leu Leu Lys Gly Asn  
 20 25 30  
 Gln Leu His Cys Gly  
 35

ES 2 369 659 T3

<210> 11

<211> 34

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

5 <400> 11

```

Glu Glu Ala Gln Gly Asp Lys Ile Ile Asp Gly Ala Pro Cys Ala Arg
 1          5          10          15
Gly Ser His Pro Trp Gln Val Ala Leu Leu Ser Gly Asn Gln Leu His
          20          25          30
Cys Gly
    
```

<210> 12

<211> 31

<212> PRT

10 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 12

```

Gln Gly Glu Arg Ile Ile Asp Gly Tyr Lys Cys Lys Glu Gly Ser His
 1          5          10          15
Pro Trp Gln Val Ala Leu Leu Lys Gly Asp Gln Leu His Cys Gly
          20          25          30
    
```

<210> 13

<211> 31

15 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 13

```

Gln Gly Glu Arg Ile Ile Asp Gly Ile Lys Cys Lys Glu Gly Ser His
 1          5          10          15
Pro Trp Gln Val Ala Leu Leu Lys Gly Asn Gln Leu His Cys Gly
          20          25          30
    
```

<210> 14

20 <211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia consenso para sitio de escisión en el extremo C-terminal de la SCCE.

<221> VARIANTE

<222> 2

<223> Asp = o bien aspartato (Asp) o glutamato (Glu).

<221> VARIANTE

5 <222> 3

<223> Lys = o bien lisina (Lys) o arginina (Arg).

<400> 14

Gly Asp Lys Ile Ile Asp Gly  
1 5

<210> 15

10 <211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> consenso de la bolsa de especificidad de sustrato.

15 <221> VARIANTE

<222> 1

<223> Thr = cualquier residuo de aminoácido.

<221> VARIANTE

<222> 3

20 <223> Ala = cualquier residuo de aminoácido.

<221> VARIANTE

<222> 5

<223> Asn = cualquier residuo de aminoácido.

<400> 15

Thr Asn Ala Cys Asn Gly Asp Ser  
1 5

25

<210> 16

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador de PCR SYM3300.

<400> 16

ggtggccctg ctcagtggca 20

5 <210> 17

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> cebador de PCR SYM3301.

<400> 17

cacatggat gacacagcct gg 22

<210> 18

<211> 20

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador de PCR SYM3302.

<400> 18

20 aataaagaaa cacaaaaccc 20

<210> 19

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> cebador de PCR SYM3418.

<400> 19

tgtaatatca ttgtgggc 18

<210> 20

30 <211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador de PCR SYM4118.

<400> 20

5 ggatgtgaag ctcatctc 18

<210> 21

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> cebador de PCR SYM4121.

<400> 21

tggagtcggg gatgccag 18

<210> 22

15 <211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador de PCR SYM4720.

20 <400> 22

gggaggggtgg agagagagtg cagtg 25

<210> 23

<211> 21

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador de PCR SYM4899.

<400>23

agtctaggct gcagccccta c 21

30 <210> 24

<211> 22

- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> cebador de PCR hEXON1.
- 5 <400> 24
- ctcgagggat ctgatgtgat cc 22
- <210> 25
- <211> 24
- <212> ADN
- 10 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> cebador de PCR mEXON1.
- <400> 25
- ctgggagtga cttggcgtgg ctct 24
- 15 <210> 26
- <211> 23
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 20 <223> cebador de PCR específico para la SCCE humana IE2.
- <400> 26
- gctctcccat tagtccccag aga 23
- <210> 27
- <211> 24
- 25 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> cebador de PCR específico para la SCCE humana MJ2.
- <400> 27
- 30 ccacttggtg aactgcaca ctg 24
- <210> 28

- <211> 18  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>
- 5 <223> cebador directo que cubre la posición 427 - 444 de la secuencia de ADNc de SCCE humana.  
<400> 28  
gccaaccccc tgaacaa 18  
<210> 29  
<211> 21
- 10 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> cebador inverso que cubre la posición 490 - 510 de la secuencia de ADNc humano en el exón cinco.  
<400> 29
- 15 acatccacgc acatgaggtc a 21  
<210> 30  
<211> 29  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial
- 20 <220>  
<223> La sonda de amplificación en tiempo real que cubre la posición 445 - 473 de la secuencia de ADNc humano en el exón cuatro.  
<400> 30  
cctgtactgt ctccggctgg ggcactacc 29
- 25 <210> 31  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>
- 30 <223> cebador de PCR mS3.  
<400> 31

caaggagaaa ggattataga tggct 25

<210> 32

<211> 21

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador de PCR 698.

<400> 32

aaggctccgc acccatggca g 21

10 <210> 33

<211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> cebador de PCR 696.

<400> 33

tgcaatggtg actcaggggg gccctt 26

<210> 34

<211> 23

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador de PCR H2.

<400> 34

25 gaccaggcg tctacactca agt 23

<210> 35

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> cebador de PCR mS4.



<400> 35  
gagaccatga aaacccatcg ctaac 25  
<210> 36  
<211> 26  
5 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> cebador de PCR KO 0905.  
<400> 36  
10 tgactttctt cacactggac gacagc 26  
<210> 37  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
15 <220>  
<223> cebador de PCR GR 0905.  
<400> 37  
cttcacactg gctgatagcc tggccg 26  
<210> 38  
20 <211> 28  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> cebador de PCR Ngr.  
25 <400> 38  
caggggtggcg gaatgacctc atggccct 28  
<210> 39  
<211> 28  
<212> ADN  
30 <213> Secuencia artificial  
<220>

- <223> cebador de PCR RÅ 1016.  
<400> 39  
ctactccaca aggacccatg tcaatgac 28  
<210> 40
- 5 <211> 28  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> cebador de PCR nRÅ 1016.
- 10 <400> 40  
gctgtgtgct ggcatcccg actctaag 28  
<210> 41  
<211> 30  
<212> ADN
- 15 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido SMART II.  
<400> 41  
aagcagtggt aacaacgcag agtacgcggg 30
- 20 <210> 42  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>
- 25 <223> cebador de síntesis de ADNc 5'-RACE.  
<221> variación  
<222> 27  
<223> n = a o g o c o t  
<400> 42
- 30 tttttttt tttttttt ttttvn 27  
<210> 43

- <211> 45  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>
- 5 <223> Cebador universal largo.  
<400> 43  
ctaatacgac tcactatagg gcaagcagtg gtaacaacgc agagt 45  
<210> 44  
<211> 23
- 10 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Cebador universal corto.  
<400> 44
- 15 ctaatacgac tcactatagg gcc 23  
<210> 45  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial
- 20 <220>  
<223> Cebador universal anidado.  
<400> 45  
aagcagtggt aacaacgcag agt 23  
<210> 46
- 25 <211> 243  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Secuencia de aminoácidos deducida de la parte C-terminal de SCCE de vaca.
- 30 <400> 46

ES 2 369 659 T3

Met Thr Thr Pro Leu Val Ile Leu Leu Leu Thr Phe Ala Leu Gly Ser  
 1 5 10 15  
 Val Ala Gln Glu Asp Gln Gly Asn Lys Ser Gly Glu Lys Ile Ile Asp  
 20 25 30  
 Gly Val Pro Cys Pro Arg Gly Ser Gln Pro Trp Gln Val Ala Leu Leu  
 35 40 45  
 Lys Gly Ser Gln Leu His Cys Gly Gly Val Leu Leu Asn Glu Gln Trp  
 50 55 60  
 Val Leu Thr Ala Ala His Cys Met Asn Glu Tyr Asn Val His Met Gly  
 65 70 75 80  
 Ser Val Arg Leu Val Gly Gly Gln Lys Ile Lys Ala Thr Arg Ser Phe  
 85 90 95  
 Arg His Pro Gly Tyr Ser Thr Gln Thr His Ala Asn Asp Leu Met Leu  
 100 105 110  
 Val Lys Leu Asn Gly Arg Ala Lys Leu Ser Ser Ser Val Lys Lys Val  
 115 120 125  
 Asn Leu Pro Ser His Cys Asp Pro Pro Gly Thr Met Cys Thr Val Ser  
 130 135 140  
 Gly Trp Gly Thr Thr Thr Ser Pro Asp Val Thr Phe Pro Gly Gln Leu  
 145 150 155 160  
 Met Cys Thr Asp Val Lys Leu Ile Ser Pro Gln Asp Cys Arg Lys Val  
 165 170 175  
 Tyr Lys Asp Leu Leu Gly Asp Ser Met Leu Cys Ala Gly Ile Pro Asn  
 180 185 190  
 Ser Arg Thr Asn Ala Cys Asn Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Met Cys  
 195 200 205  
 Lys Gly Thr Leu Gln Gly Val Val Ser Trp Gly Ser Phe Pro Cys Gly  
 210 215 220  
 Gln Pro Asn Asp Pro Gly Val Tyr Thr Gln Val Cys Lys Tyr Val Asn  
 225 230 235 240  
 Trp Ile Lys

<210> 47

<211> 249

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos deducida de la parte C-terminal de SCCE de cerdo.

<400> 47

Met Ala Arg Pro Leu Leu Pro Pro Arg Leu Ile Leu Leu Leu Ser Leu  
 1 5 10 15  
 Ala Leu Gly Ser Ala Ala Gln Glu Gly Gln Asp Lys Ser Gly Glu Lys  
 20 25 30  
 Ile Ile Asp Gly Val Pro Cys Pro Gly Gly Ser Arg Pro Trp Gln Val  
 35 40 45  
 Ala Leu Leu Lys Gly Asn Gln Leu His Cys Gly Gly Val Leu Val Asn  
 50 55 60  
 Gln Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Met Met Asn Asp Tyr Asn  
 65 70 75 80  
 Val His Leu Gly Ser Asp Arg Leu Asp Asp Arg Lys Gly Gln Lys Ile  
 85 90 95

ES 2 369 659 T3

Arg Ala Met Arg Ser Phe Arg His Pro Gly Tyr Ser Thr Gln Thr His  
 100 105 110  
 Val Asn Asp Leu Met Leu Val Lys Leu Ser Arg Pro Ala Arg Leu Ser  
 115 120 125  
 Ala Ser Val Lys Lys Val Asn Leu Pro Ser Arg Cys Glu Pro Pro Gly  
 130 135 140  
 Thr Thr Cys Thr Val Ser Gly Trp Gly Thr Thr Thr Ser Pro Asp Val  
 145 150 155 160  
 Thr Phe Pro Ala Asp Leu Met Cys Thr Asp Val Lys Leu Ile Ser Ser  
 165 170 175  
 Gln Asp Cys Lys Lys Val Tyr Lys Asp Leu Leu Gly Ser Ser Met Leu  
 180 185 190  
 Cys Ala Gly Ile Pro Asn Ser Lys Thr Asn Ala Cys Asn Gly Asp Ser  
 195 200 205  
 Gly Gly Pro Leu Val Cys Lys Gly Thr Leu Gln Gly Leu Val Ser Trp  
 210 215 220  
 Gly Thr Phe Pro Cys Gly Gln Pro Asn Asp Pro Gly Val Tyr Thr Gln  
 225 230 235 240  
 Val Cys Lys Tyr Ile Asp Trp Ile Asn  
 245

<210> 48

<211> 253

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos deducida de la parte C-terminal de la SCCE de ser humano.

<400> 48

Met Ala Arg Ser Leu Leu Leu Pro Leu Gln Ile Leu Leu Leu Ser Leu  
 1 5 10 15  
 Ala Leu Glu Thr Ala Gly Glu Glu Ala Gln Gly Asp Lys Ile Ile Asp  
 20 25 30  
 Gly Ala Pro Cys Ala Arg Gly Ser His Pro Trp Gln Val Ala Leu Leu  
 35 40 45  
 Ser Gly Asn Gln Leu His Cys Gly Gly Val Leu Val Asn Glu Arg Trp  
 50 55 60  
 Val Leu Thr Ala Ala His Cys Lys Met Asn Glu Tyr Thr Val His Leu  
 65 70 75 80  
 Gly Ser Asp Thr Leu Gly Asp Arg Arg Ala Gln Arg Ile Lys Ala Ser  
 85 90 95  
 Lys Ser Phe Arg His Pro Gly Tyr Ser Thr Gln Thr His Val Asn Asp  
 100 105 110  
 Leu Met Leu Val Lys Leu Asn Ser Gln Ala Arg Leu Ser Ser Met Val  
 115 120 125  
 Lys Lys Val Arg Leu Pro Ser Arg Cys Glu Pro Pro Gly Thr Thr Cys  
 130 135 140  
 Thr Val Ser Gly Trp Gly Thr Thr Thr Ser Pro Asp Val Thr Phe Pro  
 145 150 155 160  
 Ser Asp Leu Met Cys Val Asp Val Lys Leu Ile Ser Pro Gln Asp Cys  
 165 170 175  
 Thr Lys Val Tyr Lys Asp Leu Leu Glu Asn Ser Met Leu Cys Ala Gly  
 180 185 190  
 Ile Pro Asp Ser Lys Lys Asn Ala Cys Asn Gly Asp Ser Gly Gly Pro  
 195 200 205  
 Leu Val Cys Arg Gly Thr Leu Gln Gly Leu Val Ser Trp Gly Thr Phe  
 210 215 220  
 Pro Cys Gly Gln Pro Asn Asp Pro Gly Val Tyr Thr Gln Val Cys Lys



<400> 50

```

Met Gly Val Trp Leu Leu Ser Leu Ile Thr Val Leu Leu Ser Leu Ala
 1      5      10
Leu Glu Thr Ala Gly Gln Gly Glu Arg Ile Ile Asp Gly Ile Lys Cys
 20      25      30

Lys Glu Gly Ser His Pro Trp Gln Val Ala Leu Leu Lys Gly Asn Gln
 35      40      45
Leu His Cys Gly Gly Val Leu Val Asp Lys Tyr Trp Val Leu Thr Ala
 50      55      60
Ala His Cys Lys Met Gly Gln Tyr Gln Val Gln Leu Gly Ser Asp Lys
 65      70      75
Ile Gly Asp Gln Ser Ala Gln Lys Ile Lys Ala Thr Lys Ser Phe Arg
 85      90      95
His Pro Gly Tyr Ser Thr Lys Thr His Val Asn Asp Ile Met Leu Val
 100     105     110
Arg Leu Asp Glu Pro Val Lys Met Ser Ser Lys Val Glu Ala Val Gln
 115     120     125
Leu Pro Glu His Cys Glu Pro Pro Gly Thr Ser Cys Thr Val Ser Gly
 130     135     140
Trp Gly Thr Thr Thr Ser Pro Asp Val Thr Phe Pro Ser Asp Leu Met
 145     150     155
Cys Ser Asp Val Lys Leu Ile Ser Ser Arg Glu Cys Lys Lys Val Tyr
 165     170     175
Lys Asp Leu Leu Gly Lys Thr Met Leu Cys Ala Gly Ile Pro Asp Ser
 180     185     190
Lys Thr Asn Thr Cys Asn Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Asn
 195     200     205
Asp Thr Leu Gln Gly Leu Ala Ser Arg Gly Thr Tyr Pro Cys Gly Gln
 210     215     220
Pro Asn Asp Pro Gly Val Tyr Thr Gln Val Cys Lys Tyr Lys Arg Trp
 225     230     235
Val Met Glu Thr Met Lys Thr His Arg
 245

```

## Bibliografía

- 5 Ausubel et al. (1992). Current protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons
- Brattsand, M. & Egelrud, T. Purification, molecular cloning, and expression of a human stratum corneum trypsinlike serine protease with possible function in desquamation. *J Biol Chem* 274, 30033-30040 (1999).
- Bäckman, A., Strandén, P., Brattsand, M., Hansson, L. & Egelrud, T. Molecular cloning and tissue expression of the murine analog to human stratum corneum chymotryptic enzyme. *J Invest Dermatol* 113, 152-155 (1999).
- 10 Chavanas, S. et al. Mutations in SPINK5, encoding a serine protease inhibitor, cause Netherton syndrome. *Nat Genet* 25, 141-142 (2000).
- Diamandis, E.P., Yousef, G.M., Liu-Ying, L., Magklara, A. & Oblezu, C.V. The New Human Kallikrein Gene Family - Implications in Carcinogenesis. *Trends In Endocrinology and Metabolism* 11, 54-60 (2000).
- 15 Ekholm, E. & Egelrud, T. Stratum corneum chymotryptic enzyme in psoriasis. *Arch Dermatol Res* 291, 195-200 (1999).
- Ekholm, E. & Egelrud, T. The expression of stratum corneum chymotryptic enzyme in human anagen hair follicles: further evidence for its involvement in desquamation-like processes. *Br J Dermatol* 139, 585-590 (1998).
- Ekholm, I.E., Brattsand, M. & Egelrud, T. Stratum corneum tryptic enzyme in normal epidermis: a missing link in the desquamation process? *J Invest Dermatol* 114, 56-63 (2000).

- Hansson, L. et al. Cloning, expression, and characterization of stratum corneum chymotryptic enzyme. A skinspecific human serine proteinase. *J Biol Chem* 269, 19420-19426 (1994).
- Hogan, B., Constanini, F. & Lazy, E. 1986 In *Manipulating the mouse embryo: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Laboratory Press. (Cold Spring Laboratory Press, Cold Spring HarborNew York, 1986).
- 5 Hägermark, D., Rajka, G. & Berqvist, U. Experimental itch in human skin elicited by rat mast cell chymase. *Acta Derm Venereol (Stockh)* 52, 125-128 (1972).
- Hägermark, O. Studies on experimental itch induced by kallikrein and bradykinin. *Acta Derm Venereol (Stockh)* 54, 397-400 (1974).
- 10 Kroon, E., MacDonal, R. J. & Hammer, R. E. The transcriptional regulatory strategy of the rat tissue kallikrein gene family. *Genes and Function* 1, 309-310 (1997).
- Lindström P., Bergh A., Holm I., Damber J. E. Expression of transforming growth factor-beta 1 in rat ventral prostate and Dunning R3327 PAP prostate tumor after castration and estrogen treatment. *Prostate* 29, 209-218 (1996).
- Lusky, M. and Botchan M. Inhibition of sv40 replication in simian cells by specific pBR322 DNA sequences. *Nature*, 293, 79-81 (1981)
- 15 Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. USA
- Sondell, B., Thornell, L.E. & Egelrud, T. Evidence that stratum corneum chymotryptic enzyme is transported to the stratum corneum extracellular space via lamellar bodies. *J Invest Dermatol* 104, 819-823 (1995).
- 20 Sondell, B., Dyberg, P., Anneroth, G.K., Ostman, P.O. & Egelrud, T. Association between expression of stratum corneum chymotryptic enzyme and pathological keratinization in human oral mucosa. *Acta Derm Venereol (Stockh)* 76, 177-181 (1996).
- Vassar et al (1989) Tissue-specific and differentiation-specific expression of a human K14 keratin gene in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*.86, 1563-7.



**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Ratón transgénico que tiene integrado dentro de su genoma una secuencia de nucleótidos heteróloga que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína con una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 75% con respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2, en el que dicha proteína presenta actividad de enzima quimotríptica del estrato córneo (SCCE), y en el que dicha secuencia de nucleótidos heteróloga está operativamente unida al promotor temprano de SV40.
2. Ratón transgénico según la reivindicación 1, en el que dicho promotor temprano de SV40 operativamente unido impulsa la expresión de dicha proteína heteróloga en la epidermis.
- 10 3. Ratón transgénico según la reivindicación 1 ó 2, en el que la secuencia de nucleótidos comprende una secuencia de ADN tal como se muestra en SEQ ID NO: 1, que codifica para la SCCE humana.
4. Ratón transgénico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la secuencia de ADN codifica para el péptido mostrado en SEQ ID NO: 2.
5. Ratón transgénico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el mamífero muestra un fenotipo de piel anómalo que se asemeja a enfermedades cutáneas heredadas con hiperqueratosis epidérmica.
- 15 6. Método para preparar un ratón transgénico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende las etapas de:
- (a) construir y amplificar una secuencia de nucleótidos heteróloga que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína con una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 75% con respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2, en el que dicha proteína presenta actividad de enzima quimotríptica del estrato córneo (SCCE), y en el que dicha secuencia de nucleótidos heteróloga está operativamente unida al promotor temprano de SV40,
- 20 (b) introducir dicha secuencia de nucleótidos heteróloga en una célula de ratón,
- (c) usar dicha célula, o la progenie de dicha célula, para crear varios supuestos embriones de ratón o ratones transgénicos, y
- 25 (d) seleccionar un ratón o embrión de ratón que tiene dicha secuencia de nucleótidos heteróloga integrada dentro de su genoma.
7. Uso del ratón transgénico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, como un modelo para el estudio de enfermedad con el objetivo de mejorar el tratamiento, mitigar o mejorar un estado patogénico, para el desarrollo o las pruebas de un cosmético o una formulación farmacéutica o para el desarrollo de un método de diagnóstico en relación con enfermedad cutánea, cáncer de ovario o cáncer de piel.
- 30 8. Método para identificar un compuesto o composición eficaz para la prevención o tratamiento de un fenotipo no deseado o anómalo seleccionado de un fenotipo de piel anómalo y cáncer de piel o de ovario, comprendiendo el método
- (a) administrar un compuesto o composición a un ratón transgénico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5,
- 35 (b) evaluar el fenotipo de un ratón tratado según la etapa (a),
- (c) comparar el fenotipo de un ratón tratado con un ratón de control no tratado e
- (d) identificar el compuesto o composición como eficaz para la prevención o tratamiento del fenotipo no deseado o anómalo.
- 40 9. Método según la reivindicación 8 para identificar un compuesto o composición eficaz para la prevención o tratamiento de enfermedades cutáneas heredadas con hiperqueratosis epidérmica.
10. Método según la reivindicación 8 para identificar una composición cosmética.



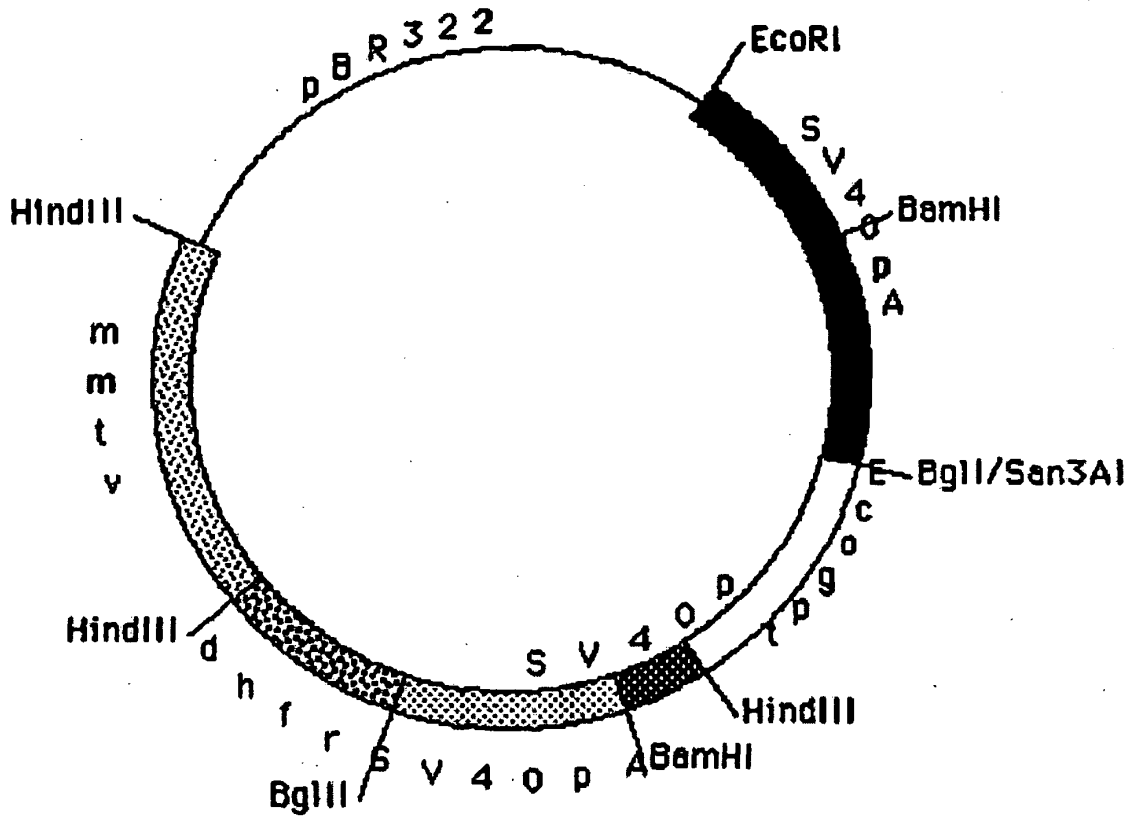


Fig. 2

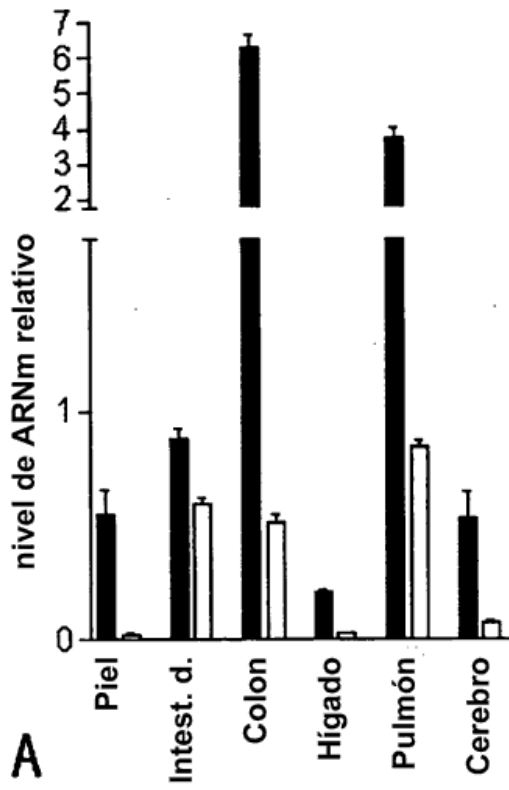


Fig. 3A

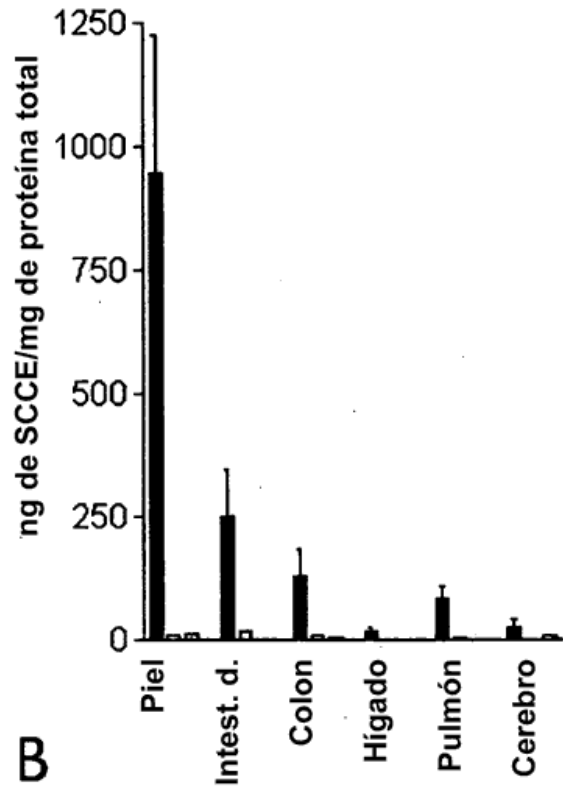


Fig. 3B

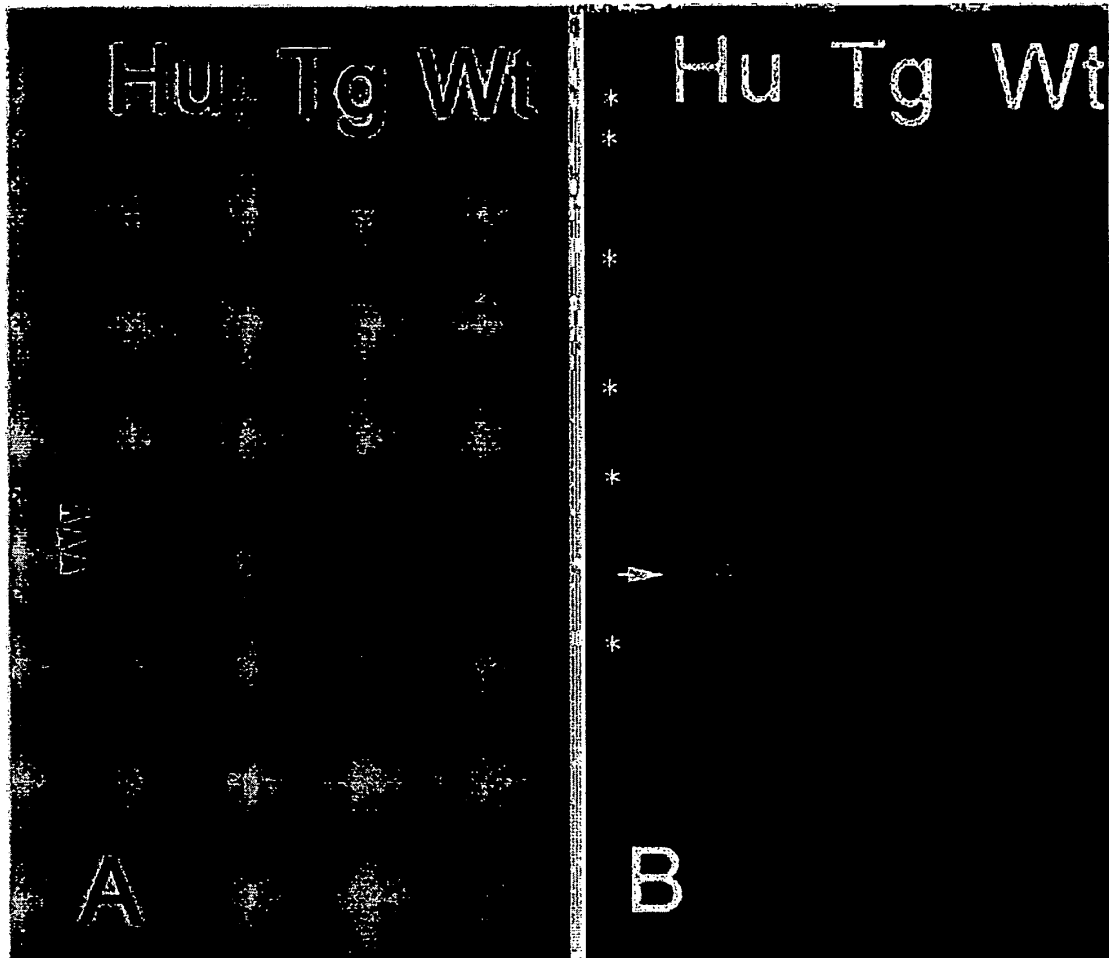


Fig. 4A

Fig. 4B

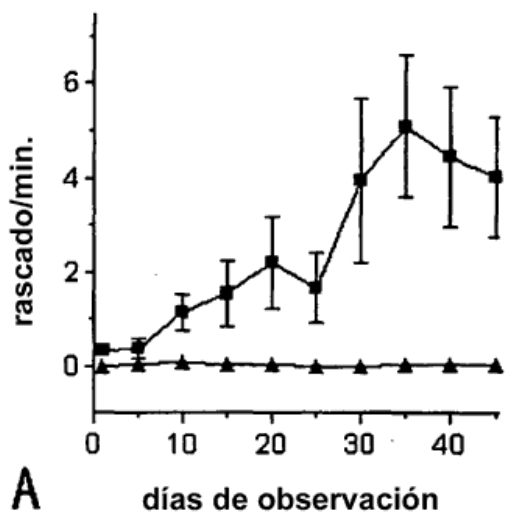


Fig. 5A



Fig. 5B

A



Fig. 6A

B

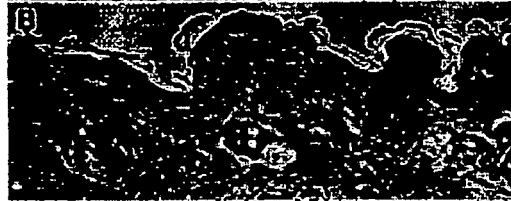


Fig. 6B

C

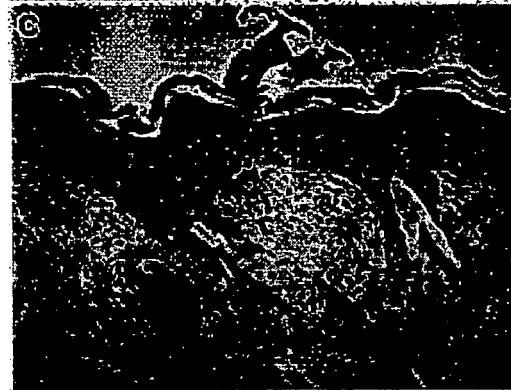


Fig. 6C

D



Fig. 6D

E



Fig. 6E

F



Fig. 6F

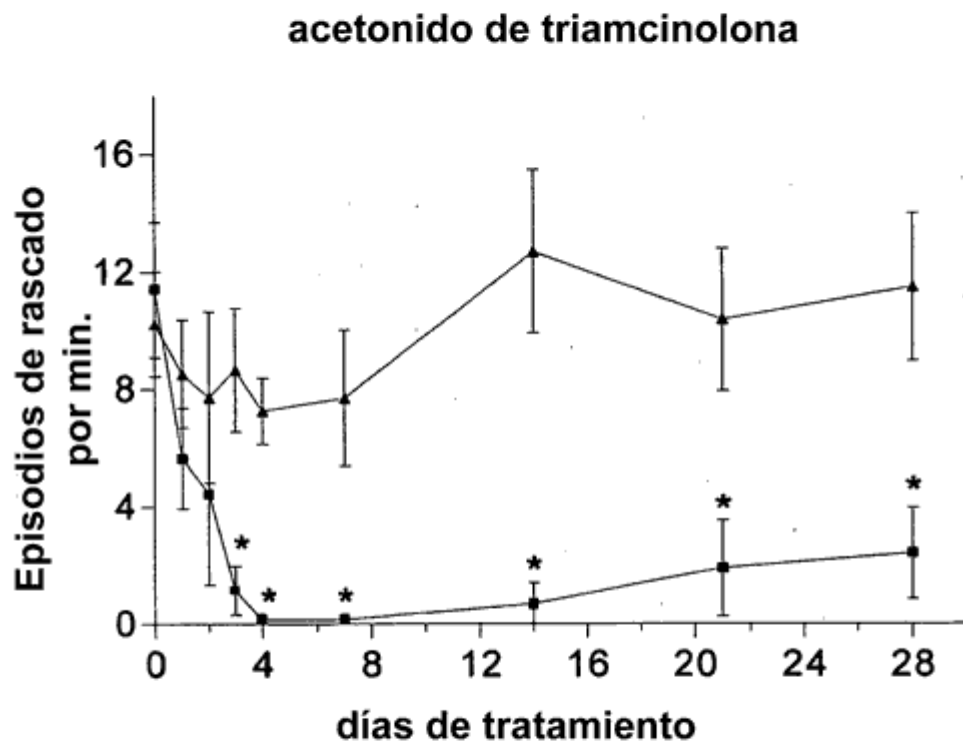


Fig. 7



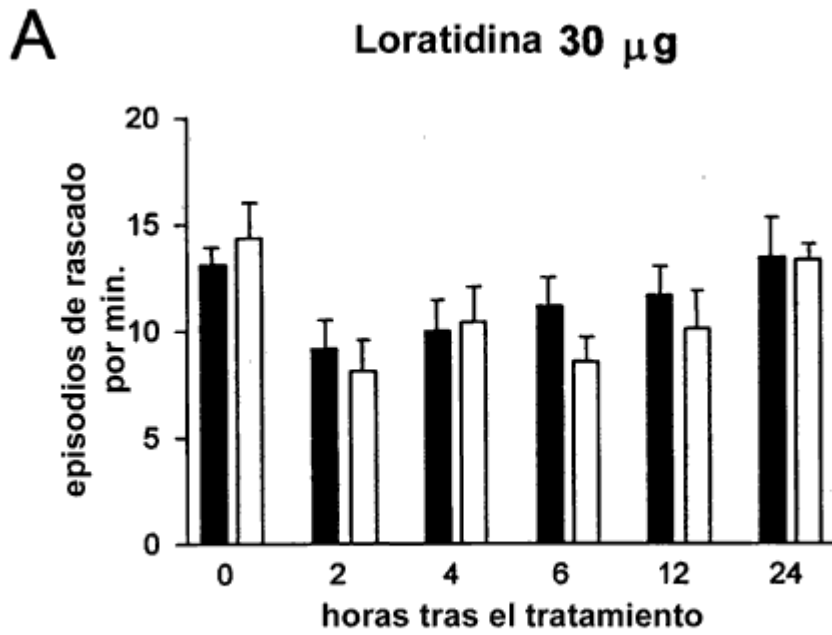


Fig. 8A

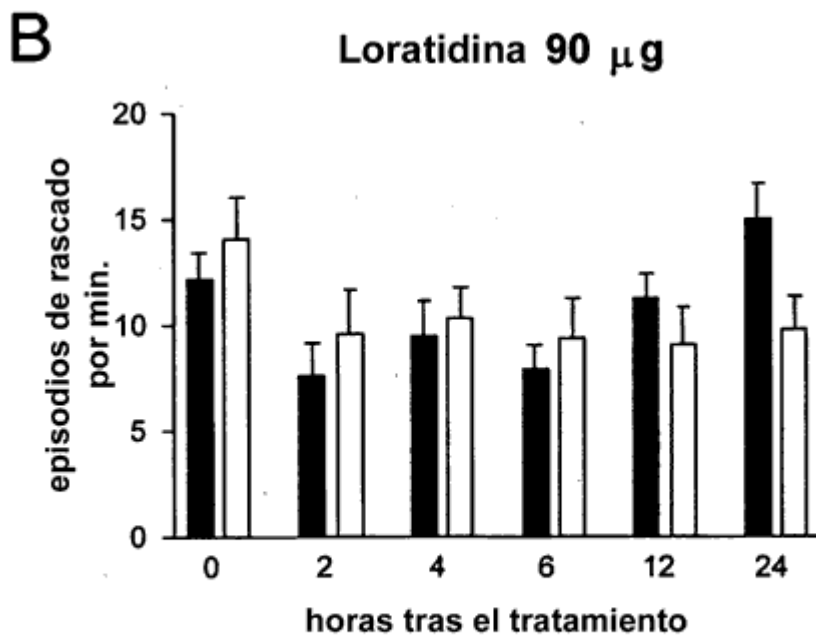


Fig. 8B